UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

Année 1971-1972 Série E. N° 255

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE
ET EXPERIMENTALE DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Olivier COULERU
né le 5 Janvier 1943

Interne Lauréat des Hôpitaux de Paris
Assistant à l'U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale
Licencié es-Sciences
A.E.A. d'Immuno-Hématologie et Immunogénétique Humaine

TITRE DE LA THESE :

L'ANTIGENE AUSTRALIE DANS LE SANG

Soutenue le 30 Juin 1972

JURY :

MM. A. GERMAN Président
A.R. PREVOT
J.P. SOULIER
J. BORY
R. MOULIAS
Examinateurs

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

Année 1971-1972 Série E. N° 255

THESE

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE HUMAINE
ET EXPERIMENTALE DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Olivier COULERU
né le 5 Janvier 1943

Interne Lauréat des Hôpitaux de Paris
Assistant à l'U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale
Licencié es-Sciences
A.E.A. d'Immuno-Hématologie et Immunogénétique Humaine

TITRE DE LA THESE :

L'ANTIGENE AUSTRALIE DANS LE SANG

Soutenue le 30 Juin 1972

JURY :

MM. A. GERMAN Président
A.R. PREVOT
J.P. SOULIER
J. BORY
R. MOULIAS
Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MON GRAND-PERE

AU SOUVENIR DE MA GRAND-MERE ET DE MA GRAND-TANTE

A MON PERE

A MA MERE

A MA FEMME

A MES FRERE ET SŒURS

A TOUS LES MIENS.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550026_0001

A Monsieur le Professeur A.R. PREVOT

Membre de l'Académie des Sciences
Membre de l'Académie de Médecine
Chef de Service Honoraire à l'Institut Pasteur

Qui nous a engagé dans la voie de la recherche biologique et nous a témoigné un intérêt qui nous touche.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de toute notre reconnaissance, de notre très profond respect et de notre admiration.

A Monsieur le Professeur A. GERMAN
Professeur de Microbiologie à l'Université René Descartes
Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris
Membre de l'Académie de Pharmacie

qui nous a accueilli au Laboratoire de Biochimie et d'Immunologie comme Interne et au Laboratoire de Virologie à la Faculté comme assistant.

Qu'il veuille être assuré de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur J.P. SOULIER
Professeur d'Hématologie à l'Université René Descartes
Directeur Général du Centre National de Transfusion Sanguine

qui nous a accueilli au Centre National et nous a intéressé particulièrement au problème de l'Antigène Australie.

Son aide à tous points de vue, son enthousiasme communicatif nous ont permis de mener à bien ce travail.

A Monsieur le Professeur J. BORY
Docteur en médecine
Professeur de Microbiologie à l'Université René Descartes
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

Nous le remercions d'avoir bien voulu faire partie de ce Jury.

A Monsieur le Docteur R. MOULIAS
Maître de Conférence Délégué en Pathologie Expérimentale
Assistant à la Clinique Médicale de la Salpétrière.

Qui a assisté à nos premiers travaux, nous a conseillé et dont la collaboration nous est précieuse.

Qu'il veuille être assuré de notre reconnaissance et de notre amitié.

A Monsieur le Professeur M. BESSIS
Directeur de l'Institut de Pathologie Cellulaire et de Cancérologie Expérimentale

Qui nous a accueilli à l'Institut et nous a enseigné les bases de l'observation du monde microscopique.

A Monsieur le Professeur Agrégé Ch. SALMON
Docteur es-Sciences

Pour l'enseignement de l'Immuno-Hématologie et l'Immuno-Génétique qu'il nous donne au Centre Départemental de Transfusion et pour la bienveillance constante qu'il nous témoigne.

A mon père le Docteur C.-B. COULERU
Directeur du Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Pau et du Béarn

Qui m'a initié depuis mon enfance aux mystères de la vie.

A Monsieur le Professeur J. LOEPER
Chef de Service de la Clinique Médicale à la Salpétrière

Qui nous a accueilli dans son service avec une bienveillance qui nous touche et nous a permis de réaliser ce travail.

A Monsieur le Professeur Agrégé A. SARRAZIN

Pour l'intérêt qu'il nous porte et pour la bienveillance avec laquelle il nous a accueilli dans son service

A Monsieur le Professeur Agrégé J. EMERIT

Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur O. BOUSQUET

Dont la collaboration nous est très précieuse. Avec notre amitié.

A Monsieur le Docteur D. FROMMEL
Maître de conférence Agrégé

Qui a bien voulu juger ce travail. En témoignage de notre amitié.

A Madame A.M. COUROUCÉ-PAUTY

Qui nous a accueilli au Laboratoire de Bactériologie et de Virologie du C.N.T.S. et nous a initié aux techniques de recherche de l'Antigène Australie.

A Monsieur A. GALLI
Chef du Laboratoire de Biochimie à la Salpétrière
et à Madame A. GALLI
Chef du Laboratoire d'Immunologie à la Salpétrière.

Pour leur bienveillant accueil dans leurs Laboratoires et en témoignage de notre sincère amitié.

A Madame F. PETER
Assistante à l'U.E.R. de Biologie humaine et Expérimentale.

Qui a mis toute sa compétence en microscopie électronique à notre service et à qui nous devons la qualité des photographies.
Qu'elle veuille être assurée de toute notre reconnaissance.

A Madame J. PANOUSE-PERIN
Maître assistant à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.

Pour son aide efficace et pour son dévouement.

Au Docteur Doris CHICOT
Hémobiologiste

Qu'elle veuille être assurée de notre amitié. Nous la remercions pour l'aide apportée.

A mes oncles

Le Docteur Jean GOURC
Le Docteur André LARRIBAU

A mon cousin

Le Professeur Alfred ROSSIER
Chef de Service de Pédiatrie à l'Hôpital St Vincent de Paul.

A mes cousins

Le Docteur Michel PERIER
Le Docteur Philippe COULERU
Le Docteur Alain GOURC
Le Docteur Edouard LARRIBAU

A tous mes Collègues de la Salle de Garde

A tous mes Collègues d'Assistanat

A tous mes amis.

Ce travail a été effectué

- au Laboratoire de Biochimie et d'Immunologie de l'Hôpital de la Salpétrière, en collaboration étroite avec la clinique médicale du Professeur J. LOEPER et le centre de Gastro-Hépato-Entérologie du Professeur Agrégé A. SARRAZIN

- au Laboratoire de Virologie de l'U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale.

- au Centre National de Transfusion Sanguine.

Nous remercions

Le Docteur G. FELDMAN de l'Institut Pierre Abrami
qui a bien voulu nous initier à sa technique de microscopie électronique.

Le Professeur J. CAROLI
et le Docteur SIRAGA
qui nous ont donné l'observation clinique de M. ROC

Madame GOZIN du C.N.T.S.
qui a effectué le dosage en Fixation du complément et en Immunoadhérence

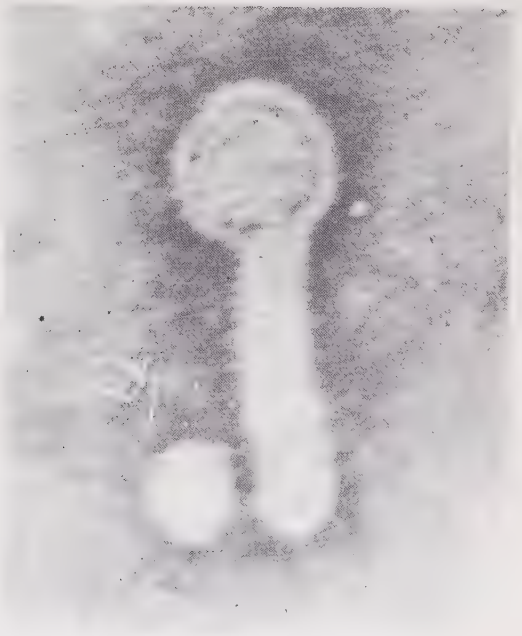
Mademoiselle LEMAIRE du C.N.R.S.
qui a effectué les ultra centrifugations pour microscopie électronique.

Les Docteurs AMOUCH et DROUET du C.N.T.S.
qui ont réalisé le dosage radio immunologique.

Le Professeur Agrégé Doris MENACHE
du Laboratoire d'Hématologie de Beaujon.
qui nous a confié le sérum initial de la P.A.N.

Le Professeur Agrégé GENTILINI
Pour l'observation clinique et les sérums de la maladie de KAPOSI.

L'ANTIGÈNE AUSTRALIE DANS LE SANG



PLAN

Pages

INTRODUCTION 1

HISTORIQUE 3

LES METHODES D'ETUDES 7

- Matériel d'étude
- Techniques immunologiques
- Etude comparée des méthodes immunologiques utilisées - leur apport dans la connaissance de l'AgAu circulant.
- Microscopie électronique

CORRELATIONS ENTRE LA CLINIQUE, L'ETUDE IMMUNOLOGIQUE ET LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE L'ANTIGENE AUSTRALIE 28

- Renseignements cliniques indispensables
- Objectifs de cette étude
- Les cas cliniques

L'ANTIGENE AUSTRALIE : SA MORPHOLOGIE ET SON ASPECT DANS LE SANG

- L'examen des grilles en microscopie électronique 97
- Les particules présentes dans les sangs AgAu+
- Relation entre ces différentes structures
- Répartition des particules dans le sang
- Conception virale de l'AgAu

LIBERATION DE L'ANTIGENE AUSTRALIE DANS LE SANG AU COURS DES HEPATITES 116

- Apparition de l'AgAu pendant la phase initiale
- La morphologie de l'AgAu au moment de l'hépatolyse

ETAT DE L'ANTIGENE AUSTRALIE DANS LE SANG EN RELATION AVEC LA CLINIQUE. PATHOGENIE DE L'AgAu 119

- Les types de particules présentes : influence de l'immunité.
- Persistance de l'AgAu dans le sang
- Les complexes immuns
- Pathogénie de l'Ag Au

ESQUISSE D'UNE HYPOTHESE D'UN MECANISME DE TOLERANCE IMMUNITAIRE ACQUISE POUR EXPLIQUER LA PERSISTANCE DE L'AgAu 129

CONCLUSION. 132

INTRODUCTION

La notion de virus a beaucoup évolué au cours des temps. Ce mot latin est retrouvé dans les écrits de Cicéron, Virgile et Pline avec le sens général de venin, poison et déjà d'infection. Il a fallu attendre la fin du 19ème siècle, avec le début de l'ère pasteurienne, pour que le terme prenne un caractère plus restrictif et ne s'applique qu'aux agents des maladies infectieuses. Grâce aux progrès des techniques d'étude, de filtration et de microscopie, on distingue parmi les microbes, les ultra virus ou virus filtrants.

Les premiers virus humains connus sont ceux de la fièvre jaune (1901) et de la rage (1903). Depuis 20 ans environ, les découvertes de virus se sont multipliées ; les études structurales et physico-chimiques, grâce au perfectionnement des techniques et des connaissances et la mise en évidence de leur parasitisme cellulaire, ont permis d'envisager une prophylaxie contre ces maladies souvent graves et mortelles provoquées par ces agents inframicroscopiques. L'utilisation des vaccins dont Pasteur est le précurseur est le moyen de lutte préventive contre les grands fléaux comme la Rage, la Variole, la Fièvre Jaune, la Poliomyélite etc.

La mise au point d'un vaccin contre une maladie virale comporte l'isolement, l'identification puis la culture sur cellule du virus responsable.

Parmi les maladies dont l'extension dans le monde et la grande fréquence dans tous les pays représentent un problème majeur de santé publique, l'hépatite virale est toujours au premier plan. Cette affection sévit chez l'homme sans doute depuis l'antiquité ; et malgré une somme impressionnante de recherches nos connaissances sur une maladie aussi répandue sont paradoxalement fort incomplètes. Quand on sait que le risque de transmission d'une hépatite virale est actuellement un des problèmes principaux posés par la transfusion sanguine et que ce risque est accru considérablement par l'utilisation d'un nombre plus élevé de flacons émanant de donneurs différents - exsanguino-transfusion, chirurgie cardiaque, hémodyalisés,transplantation d'organes - on comprend l'importance de la mise au point d'un moyen sérologique de dépistage du virus, d'une prophylaxie et de traitements de l'hépatite virale.

L'absence d'animal réceptif a représenté une difficulté majeure pour l'étude de l'hépatite virale et l'impossibilité de l'expérimentation animale explique que dès les années 40, on s'est orienté, aux Etats Unis, vers l'inoculation à des volontaires. Cette expérimentation humaine (prisonniers, enfants débiles) conduite sur une large échelle a soulevé évidemment de vives réticences mais on lui doit une grande partie de nos connaissances sur l'épidémiologie des hépatites. L'origine virale a pu être affirmée de façon certaine et il est apparu d'autre part que l'on devait distinguer deux maladies différentes, l'hépatite infectieuse due au virus A et l'hépatite d'inoculation (dite encore du sérum homologue ou hépatite sérique) due au virus B.

Sur le plan virologique une distinction aussi tranchée n'est pas apparue toujours aussi clairement.

L'hépatite infectieuse se présente sous l'aspect d'une maladie sporadique,endémique ou épidémique avec une incubation allant de 15 à 40 jours. La contamination se fait essentiellement par voie digestive, par l'intermédiaire de souillures d'origine fécale. Le vecteur du virus est presque toujours l'eau de boisson lorsque l'hépatite revêt la forme épidémique.

L'hépatite d'inoculation est une affection qui peut être transmise à l'occasion d'un acte thérapeutique comportant l'administration volontaire ou accidentelle de sang ou d'un produit dérivé du sang, et la transfusion sanguine est de loin la cause la plus fréquente. Mais la contamination accidentelle à l'occasion d'une injection intraveineuse, intramusculaire ou sous-cutanée utilisant une seringue souillée est un fait classique (ictère de la seringue). De même la transmission peut se faire par une simple coupure, par une piqure accidentelle ou volontaire (toxicomanes et drogués) ou par contact avec une excoriation parfois minime.

On sait qu'il n'existe pas d'immunité croisée entre ces deux hépatites. La prévention par l'injection de gamma globuline est efficace pour l'hépatite épidémique alors qu'elle paraît totalement inactive pour l'hépatite sérique.

Toutes les tentatives d'isolement du virus sont restées vaines jusqu'à ces dernières années et les résultats étaient souvent contradictoires. Le dépistage des porteurs sains de virus a tenu en échec pendant longtemps les tests biologiques les plus sensibles comme le dosage des transaminases.

Aussi la mise en évidence d'un **Antigène spécifique** de l'hépatite à virus a représenté un pas décisif dans la connaissance de cette affection et une acquisition d'une importance primordiale. Le fait de pouvoir détecter dans le sang d'un sujet un antigène spécifique (Ag) et de pouvoir ainsi l'écarter du don du sang, semble déjà un moyen prophylactique que tous les transfuseurs et responsables de la transfusion sanguine ont accueilli avec intérêt. En rendant obligatoire sa recherche sur tous les flacons de sang et en écartant tous les flacons, donc les donneurs de sang qui ont l'Ag, les pouvoirs publics entendent ainsi montrer l'importance et la valeur de cette découverte (recherche de l'Ag rendue obligatoire depuis le 7 décembre 1971). Cet Ag a été appelé **ANTIGENE AUSTRALIE** (AgAu) par BLUMBERG qui l'a découvert en 1964.

Trouvé dans le sang de sujets atteints d'hépatite avec une assez grande fréquence, il est identifié aussi dans le sang de nombreux sujets qui sont apparemment indemnes de toute affection (et en particulier d'hépatite), avec des fréquences variant selon les régions du globe considérées,(fréquence qui peut atteindre 20 % dans certaines populations en Afrique et au Pérou). L'AgAu est mis en évidence aussi dans de nombreux cas pathologiques avec une fréquence et une persistance qui dépendent des affections considérées : Chez les polytransfusés : leucémies, dialysés; dans la lèpre lepromateuse ; le syndrome de Down ; dans la périartérite noueuse etc.

On a rassemblé sous le vocable de maladies viro-induites, les affections pathologiques provoquées ou déclenchées par l'antigène Australie. C'est ainsi que certains ont relié sa présence dans le sang avec la fréquence des hépatomes en Afrique ; on pense qu'il a un rôle majeur dans la sclérose hépatique ; et on a voulu le mettre en cause comme agent responsable de la cirrhose biliaire primitive.

L'AgAu est fugace chez les sujets atteints d'hépatite "banale", alors qu'il peut persister jusqu'à 5 ans et plus et exister ainsi à l'état permanent, chez des "porteurs sains". Pour expliquer cette virémie, on a invoqué des phénomènes de tolérance acquise et de tolérance constitutionnelle anormale. La relation exacte entre l'AgAu et le virus reste à établir ; est-il le virus lui-même ou un composant ? ou un produit de dégradation ?

Les problèmes soulevés par la présence de l'AgAu dans le sang sont très nombreux ; nous nous sommes intéressés à l'aspect qualitatif et quantitatif en relation directe avec la clinique.

La mise au point de méthodes d'approche et leurs utilisations coordonnées ont été un des buts que nous avons poursuivi pensant ainsi avoir une idée plus précise sur la morphologie, la dynamique de libération dans le sang et l'incidence pathologique sur l'organisme de l'AgAu.

HISTORIQUE

Il est intéressant de retracer l'historique de l'Antigène Australie, car il nous enseigne comment, en partant d'une étude des isoprécipitines, par un enchaînement de travaux successifs de dépistage de cet Ag dans différentes populations puis dans de nombreux cas pathologiques et par des études épidémiologiques, physico-chimiques et immunologiques, la conception de l'Ag Au en tant que marqueur sérologique de l'hépatite sérique (ou hépatite d'inoculation) a été acquise.

Blumberg et ses collaborateurs de Philadelphie recherchaient dans le sérum des polytransfusés des anticorps précipitants contre des antigènes sériques (24). C'est ainsi qu'ils découvrent le système Ag, transmis génétiquement, lipoprotéines de type B. Ils étudient systématiquement diverses populations et découvrent sept spécificités différentes.

En 1964, continuant leurs recherches dans le but d'isoler de nouveaux allotypes de β lipoprotéines dans le système Ag en mettant en contact des sérums d'hémophiles polytransfusés avec des sérums normaux de sujets appartenant à plusieurs ethnies, ils observent le fait suivant (25-27) : le sérum d'un aborigène australien seul parmi 24 sérums étudiés, mis à diffuser en agarose en face de 2 sérums d'hémophiles selon la technique d'immunodiffusion d'Ouchterlony, donnait naissance à une ligne de précipitation différente et en non identité avec celle donnée par les β lipoprotéines. Cette ligne ne se colorait que faiblement par le noir Soudan, mais prenait très bien les colorants des protéines (azocarmin, amidoschwartz).

L'antigène ainsi révélé par hasard fut appelé "Antigène Australie" pour ne pas préjuger de sa nature exacte, et vu l'origine du donneur.

En 1967 - 1968, l'équipe de Philadelphie apporte des précisions : cet antigène est bien distinct des lipoprotéines par la fréquence de l'anticorps qu'il provoque chez les polytransfusés -(en effet, 28 % des hémophiles polytransfusés ont dans leur sérum l'anticorps précipitant réagissant avec l'Ag Au)-, par sa grande taille moléculaire -(il apparaît au niveau du premier pic de chromatographie sur séphadex G 200)-, par sa densité supérieure à 1063 en ultracentrifugation (1063 à 1021). Il s'agit donc bien d'un nouvel Ag et les propriétés précipitantes des sérums d'hémophiles sont dues à un anticorps. En effet, la chromatographie sur DEAE cellulose permet d'isoler l'activité au niveau des γ globulines qui sont électivement précipitées par les sérums anti Ig G.

Dans l'espoir de démontrer la transmission génétique de ce nouvel Ag, Blumberg entreprend des études géographiques, ethniques et familiales. Il montre que l'Ag Au apparaît rarement dans la population blanche américaine (1 environ sur 1.000 à 3.000), mais il est beaucoup plus fréquent dans les pays tropicaux : 20 % au Pérou, 9,5 % au Ghana, 6 % au Vietnam. Il montre la persistance du caractère lors de plusieurs examens successifs.

De leur côté, Okochi et Murakami, au Japon, trouvent que 1 % des sujets normaux japonais ont l'Ag Au et signalent que celui-ci est plus fréquemment rencontré chez les polytransfusés (162).

Les études familiales (29) sur les peuplades des Iles Marshall, Cebu et Philippines permettent à Blumberg de penser que l'hypothèse d'une transmission génétique ne peut pas être éliminée. Les sujets possédant le gène Au 1 en double dose extérioriseraient le caractère Au + tandis que ceux qui ne le possèderaient qu'en simple dose seraient Au – (32).

Dans un deuxième temps, Blumberg étudie la répartition de l'Ag Au dans des cas pathologiques. Il le rencontre avec une fréquence importante chez les leucémiques (variant de 10 à 14 % suivant les types de leucémies), 4 % dans les thalassémies, 29 % dans la trisomie 21 (mongoliens rassemblés dans des Institutions d'enfants), les lépreux (9 %) ; enfin, 20 % des sujets atteints d'hépatite infectieuse virale ont l'Ag Au dans leur sang, mais il remarque, chez ces sujets, la disparition de l'Ag quelques mois plus tard ; observation importante allant à l'encontre d'une transmission purement génétique (26 - 30 - 31 - 36).

En 1967, Okochi montre la relation entre l'injection de sang Au + et l'hépatite transfusionnelle et trouve une corrélation entre la présence de l'Ag dans le sang et l'augmentation des transaminases (162).

En 1968, Prince d'une part, Blumberg de l'autre prennent conscience simultanément de l'importance jouée par l'hépatite dans l'étiologie de l'Ag Au. Prince en effet décrit l'Ag SH (Sérum Hépatitis) (170) qu'il considère comme étant spécifique de l'hépatite post transfusionnelle et qui se révèle bientôt identique à l'Ag Au de Blumberg (172). Ce dernier trouve l'Ag Au chez 34 % des hépatites considérées comme post transfusionnelles et d'autre part dans 13 % des hépatites dites infectieuses.

La microscopie électronique permet de révéler que l'Ag Au est plus qu'un simple support d'une antigénicité Au. Grâce à l'approche structurale que permet l'observation microscopique à des grossissements de plusieurs dizaines de milliers, des particules organisées sont visualisées.

En effet, Bayer et Blumberg (21), après ultracentrifugation en gradient de saccharose des sérums Ag Au + de malades atteints de leucémie, de syndrôme de Down et d'hépatite, et après coloration négative de la fraction riche en Ag Au par le silicotungstate de sodium, observent des particules de 19 à 21 nm d'aspect viral et quelques formes allongées. Ces particules sont agglutinées par des anticorps anti Au d'origine humaine et animale (lapin). Elles semblent donc porter à leur surface les déterminants de l'Ag Au.

Des lésions d'hépatite sont trouvées chez les mongoliens, porteurs de l'Ag Au, par ponction biopsie du foie ; de même qu'une augmentation des transaminases. La contamination par un agent transmissible de l'hépatite apparaît dès lors être le dénominateur commun aux leucémies, thalassémies et mongolisme.

Prince en 1968, puis Blumberg en 1969, signalent que l'Ag peut subsister pendant des mois et des années (que l'hépatite passe à la chronicité ou au contraire ait été inapparente).

La découverte de cet Ag Au circulant, la relation avec l'hépatite d'inoculation ou sérique, le fait que des millions de sujets apparemment sains peuvent être reconnus dans le monde comme "porteurs d'Ag Au" donc contaminants par leur sang, font que de nombreux chercheurs comprenant l'importance de l'enjeu et au premier plan les responsables de la transfusion sanguine se lancent dans des recherches virologiques, immunologiques, épidémiologiques, biochimiques et thérapeutiques.

Les techniques de détection de l'Ag Au sont mises au point dans le sens d'une sensibilisation toujours plus poussée de la mise en évidence de l'Ag circulant des porteurs sains et des malades et de nombreuses techniques immunologiques (connues) sont appliquées à l'Ag Au.

Millman et Collaborateurs, en 1969, en utilisant des anticorps marqués à la fluorescéine localisent les particules antigéniques au niveau de la membrane nucléaire des hépatocytes (152). Il est confirmé que l'Ag est spécifique de l'hépatite à virus ; il n'est trouvé ni dans la mononucléose infectieuse ni dans les affections hépatiques non virales.

Zuckerman rappelle les difficultés de transmission du virus à l'animal et l'absence apparente d'animal susceptible (ce qui explique que les véritables progrès de nos connaissances aient été obtenus par des expériences de transmission à des humains : enfants débiles de Willowsbrook, prisonniers, drogués . . .).

Blumberg détecte l'Ag Au chez trois espèces de primates : chimpanzés, singes verts d'Afrique et singe écureuil, ce qui renouvelle l'épidémiologie de l'expérimentation animale du virus de l'hépatite.

Toute une série de travaux de Blumberg, Schulman, Gocke et Kavey semble concorder pour suggérer que les virus A et B sont identiques et que le mode d'inoculation ou bien la dose infectante sont responsables des durées différentes d'incubation des 2 hépatites. Contre cette conception unitaire de l'hépatite virale s'inscrivent les constatations de Prince et de Giles et Collaborateurs qui ont fait une remarquable étude épidémiologique des hépatites dans l'école de Willowsbrook.

Chez des enfants inoculés à leur entrée, il a été possible de distinguer deux groupes cliniques, épidémiologiques et immunologiques d'hépatite : l'un dû au virus " MS 1 " très contagieux, à incubation courte, répondant à la définition de virus A ; l'autre transmis par voie parentérale et à incubation plus longue dû au virus " MS 2 " correspondant au virus B. Le virus MS 2 peut être transmis par voie non parentérale mais avec une contagiosité beaucoup plus faible que MS 1. (125 - 126)

L'association du seul virus " MS 2 " à l'Ag Au est confirmée par Giles (86).

La conception dualiste des hépatites à virus semble prévaloir aujourd'hui. Giles et Krugman font une constatation intéressante qui rejoint l'hypothèse de réactions immunologiques différentes à l'égard des virus A et B. Ils étudient le taux des immunoglobulines dans les hépatites à virus MS 1 et MS 2 et remarquent que les Ig M sont augmentées électivement dans les infections à MS 1, alors qu'elle varient peu dans les infections à virus MS 2 (85).

Confirmation est faite de la présence de l'Ag Au dans les hépatocytes (dans le noyau et le cytoplasme de sujets atteints d'hépatite), en utilisant des anticorps animaux et humains marqués par la fluorescéine.

De nombreux essais de mise en évidence d'acide nucléique dans les particules d'Ag Au restent vains.

En 1969, Almeida et Waterson montrent par la microscopie électronique, dans le sérum de trois sujets, des aspects différents de l'Ag Au : le premier est un "porteur sain" et des particules rondes et allongées sont présentes et dispersées ; le second a une hépatite chronique active : les particules sont en partie agglutinées et en partie libres ; le troisième a une hépatite fulminans, avec présence d'agglutinats de particules rondes et absence de particules tubulaires avec un pléomorphisme des particules rondes. Sur ces trois observations : sans production d'Ac avec Ag en excès, et avec Ac en excès, ces auteurs émettent l'hypothèse que la durée et la gravité d'une hépatite seraient dues à la production d'Ac ; celle-ci pouvant être nulle chez les porteurs sains, limitée dans le cas d'hépatite chronique et en excès dans le cas d'hépatite fulminans (6)

En 1970 Dane, Almeida, Zuckerman montrent la présence dans le sang Au + de particules plus grandes que les formes rondes, de 40 nm environ et pensent que ces particules pourraient, en fait, correspondre au virus (62).

Mais tous les essais de culture du virus de l'hépatite sur cellules (embryonnaires, diploïdes humains) sont restés vains jusqu'à ce jour. Par ailleurs, les tentatives d'isolement et d'identification d'un acide nucléïque à partir d'Ag Au n'ont pas abouti mais dernièrement les polonais prétendent avoir identifié un acide ribonucléique, ARN (116). Ces résultats demandent confirmation.

Aujourd'hui, ou tient pour acquit qu'un sang Au + transfusé à un patient transmet à ce dernier, avec un fort pourcentage, une hépatite (dans 50 % des cas suivant les dernières statistiques américaines).

L'Ag Au peut être considéré comme un marqueur sérologique de la présence du virus B.

LES MÉTHODES D'ÉTUDE

Pages

I - MATERIEL d'ETUDE 9

II - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES 9

1° - **Les méthodes de précipitation** 10

a) - Immunodiffusion simple (ID)
b) - Electro-immunodiffusion (E I D)
c) - Techniques quantitatives :

- méthode de Mancini
- méthode de Laurell

2° - **Les méthodes mettant en jeu l'activation du complément** 18

a) - La fixation du complément
b) - L'immuno-adhérence - Hémagglutination

3° - **La méthode d'agrégation plaquettaire** 21

4° - **Réactions d'agglutination passive** 21

a) - Réaction d'agglutination Latex et bentonite
b) - Hémagglutination passive.

5° - **Méthode radio-immunologique** 22

6° - **Immunofluorescence** 23

III - ETUDE COMPAREE des METHODES IMMUNOLOGIQUES UTILISEES - LEUR APPORT dans la CONNAISSANCE de l'Ag Au CIRCULANT. 23

IV - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 25

1 - **Principe**

2 - **Mode opératoire.**

1°) Les sérums
2°) La centrifugatio
3°) La coloration
4°) Les colorants
5°) La préparation des grilles

3 - **Le microscope**

4 - **L'examen microscopique**

La méthodologie employée pour obtenir les sérums Ag Au + est rapportée dès le début de ce chapitre. Puis nous décrivons les moyens d'études immunologiques et en microscopie électronique de l'Ag Au dont nous disposons.

Les principales méthodes immunologiques sont passées en revue et une comparaison est faite entre ces différents moyens d'étude. Deux techniques : l'immunodiffusion et l'électro-immunodiffusion, qui nous servent de référence, sont exposées particulièrement en détail et nous rapportons l'expérimentation et la mise au point que nous avons faites au laboratoire de Biochimie et Immunologie.

Au Centre National de Transfusion Sanguine, nous avons pu étudier deux techniques qui ont été mises au point et qui y sont pratiquées : la fixation du complément et l'immunoadhérence.

Dans un but de curiosité plus que d'intérêt pratique, nous avons effectué la méthode de Laurell dont les principales modalités techniques sont rapportées et qui ont été décrites par Pesendorfer.

Nous attirons l'attention sur l'intérêt de l'aspect semi-quantitatif de l'Ag Au, notion importante que nous avons établie pour étudier sa dynamique de libération.

La microscopie électronique a pu être pratiquée au Laboratoire de Virologie et Immunologie à l'U.E.R. de Biologie Humaine et Expérimentale ; nous avons standardisé et mis au point une méthode simple et rapide dont les principes de base nous ont été donnés par Monsieur G. Feldman de l'Institut Pierre Abrami. La technique est décrite en détail ainsi que les modalités de l'examen microscopique.

MATERIEL D'ETUDE

L'Ag a été recherché dans le sérum ou le plasma de malades et de sujets sains.

Une grande partie des Ag provient d'une détection systématique sur des prélèvements de sang envoyés au laboratoire pour un bilan hépatique (tests de floculation, électrophorèse, transaminases). Une sélection pour une limitation des réactions a été ainsi effectuée dans le recrutement des Ag Au et une orientation hépatique a été donnée au départ à ce dépistage. D'autres sérums, d'origines différentes, nous ont été fournis. Tous les sérums ou plasmas ont été immédiatement séparés par fractions de 1 à 2 ml en tube à hémolyse et congelés à - 20° C avant même leur étude immunologique et en microscopie électronique. Plus de 4.000 dépistages ont été pratiqués.

Les Ag Au et les Ac anti Au ont été titrés puis examinés au microscope électronique.

La réaction de dépistage à laquelle nous avons fait appel a été l'électro-immunodiffusion (E-I-D). Les sérums Ag Au + ont été repris en Immunodiffusion (ID) et pour certains, par des techniques comme la fixation du complément (FC), l'Immuno-adhérence (IA) et le dosage radio-immunologique.

TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

Il est intéressant de considérer que toutes les méthodes immunologiques de détection ou de dosage que nous connaissions ont été appliquées à l'Ag Au

Plusieurs impératifs ont conduit les recherches vers une application de méthodes immunologiques connues pour la détection de l'Ag Au et de l'Ac anti-Au :

1°) augmentation de la sensibilité de détection tout en conservant la spécificité.

2°) miniaturisation des techniques - en particulier à cause de la rareté des sérums Ac anti Au et des difficultés d'obtention des Ac anti Au animaux.

3°) automatisation des techniques avec les nécessités que cela comporte principalement pour les Centres de Transfusion Sanguine.

Ces techniques sont basées sur la réaction Ag-Ac et elles varient en fonction des méthodes de mise en évidence du complexe Ag Ac formé.

1°) LES METHODES DE PRECIPITATION

Elles nécessitent toutes l'emploi d'anticorps à propriétés précipitantes.

a) **Immunodiffusion simple** (I.D)

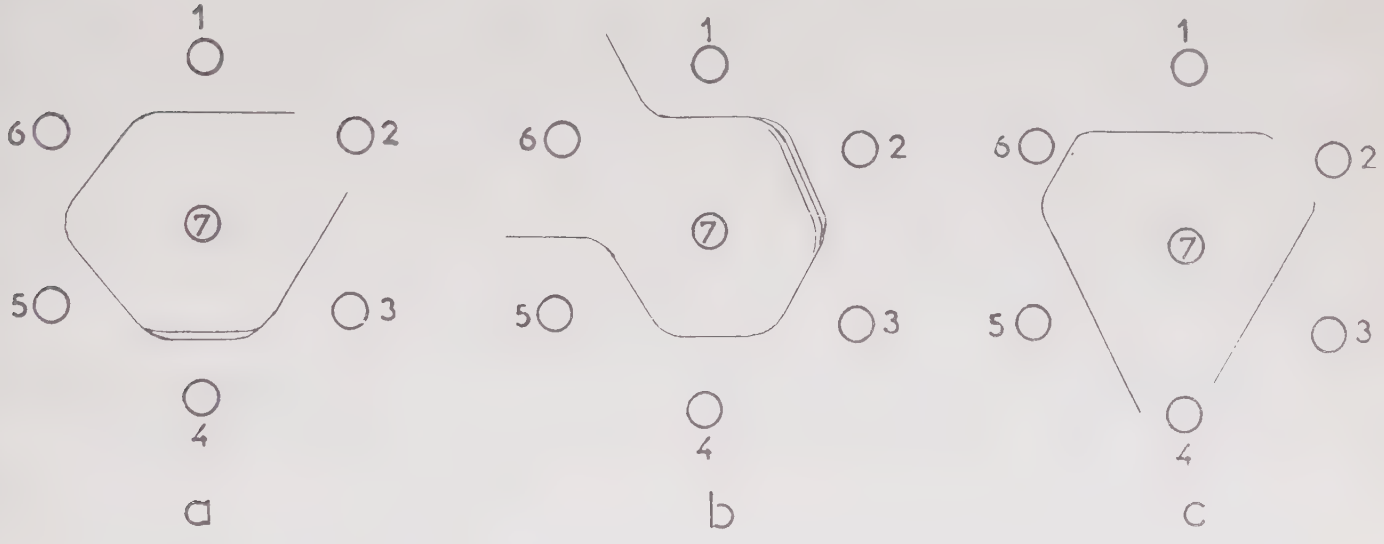
Préconisée par Blumberg et Collaborateurs, elle demeure la méthode de référence.

C'est une double diffusion de l'Ag Au et de l'Ac anti Au dans un gel d'agarose en microméthode dérivée de la méthode initiale d'Ouchterlony. Leur rencontre forme une ligne de précipitation qui est observée en lumière latérale ou après coloration.

L'agarose est utilisée à 0,9 % dans le tampon conseillé par Prince (170) constitué de chlorure de sodium (0,1 M), TRIS (0,01 M) et EDTA (0,001 M) et ajusté à pH 7,6.

Les dispositifs des puits contenant les réactifs sont les suivants :

- en couronne :

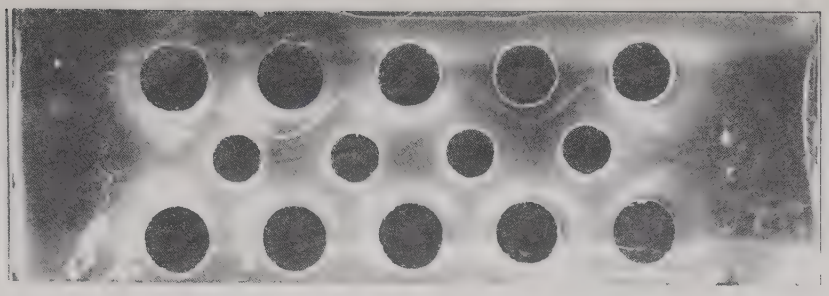


Légende A : puits de 3 mm de diamètre

en 1 3 5 sérums Antigène Au + connus

en 2 4 6 sérums à étudier

. 2 a et 4 c : sérums négatifs
. 6 a et 4 b : sérums Ag Au +
. 4 a et 2 b : Ag Au + présentant respectivement une double et une triple ligne
. 2 c : Ag Au limite de positivité
arrêt et déviation légère à l'extrémité des lignes de précipitation



Légende B : L'anticorps de référence est mis dans les puits de 3 mm et les sérums à tester dans les puits de 6 mm.

Le gel est coulé 24 h à l'avance et conservé en chambre humide avant le dépôt des sérums qui est effectué dans les puits avec les réactifs, suivant le dispositif indiqué sur les schémas A et B.

Les réactifs :

Anticorps : sérum humain (BRO = malade atteint d'un cancer de l'œsophage, ayant fait une hépatite post transfusionnelle avec d'emblée un Ac à titre élevé sans Ag Au circulant décelable auparavant) obtenu par plasmaphérèse.
titrant 1/32e en I.D. et 1/128e en E.I.D. - il est utilisé dilué au 1/2 dans du sérum physiologique et a été essayé préalablement sur 80 Ag.

Antigène : titre 1/8e en I.D et a été étudié contre 43 Ac.

Les quantités de réactif utilisées sont de 15 à 20 µl.

La lecture a été effectuée après 24 à 72 h de diffusion avec un éclairage latéral. Les arcs ont aussi été colorés par l'amidoschwartz.

Résultats et interprétation :

1. Tous les sérums qui donnent une ligne en présence de l'Ac, qui est en identité avec les lignes données par les Ag voisins, sont considérés comme Au +.

2. Tous les sérums qui ne donnent pas de ligne visible mais qui provoquent un arrêt ou une déviation à l'extrémité des lignes voisines sont concentrés par ultracentrifugation et repris en I.D. Ces sérums sont en général aussi Au +.

3. Des lignes doubles et même triples sont observées en identité avec les lignes des Ag voisins. Ces sérums sont aussi Au +. Nous avons étudié la formation de ces lignes composées et nous avons essayé d'en comprendre leur signification. (59).

Ils caractérisent certains Ag et semblent liés à la présence de différents types de particules d'Ag réparties d'une manière hétérogène.

Une augmentation de la sensibilité de la technique est obtenue en agissant sur les réactifs et sur les sérums essayés, mis en présence :

1 - par recharge des puits en réactifs jusqu'à 2 et 3 fois.
2 - par concentration de l'Ag par ultracentrifugation, 1 heure à 45.000 g ; le culot est récupéré.
3 - par concentration de l'Ac anti Au.

a) par lyophilisation et reprise par un volume d'eau distillée inférieur (jusqu'à x 3).

b) par l'acide caprylique qui permet d'obtenir des γ globulines semi-purifiées (concentration x 10) - une microméthode de cette technique sur 1 ml de sérum est aussi employée (211).

Les fausses réactions

Il faut savoir que certains Ac des groupes sanguins et des Ac anti-immunoglobulines ainsi que des anti-lipoprotéines peuvent précipiter en présence des Ag correspondants. Dans tous les cas, l'arc n'est pas en identité avec ceux des Ag voisins, d'où l'intérêt du dispositif utilisé pour la détection de l'Ag Au en I.D. Nous avons pu constater en effet que certains sérums de sujet O (ABO) possédant un anti A immun donnent une ligne de précipitation avec le sérum d'un sujet A avec substance A sérique. Un anti-Lewis peut précipiter avec la substance Lewis et il existe des anti Ig M, anti Ig G, anti Ig A ainsi que des anti-lipoprotéines. Blumberg en effet a signalé dans un sérum la présence d'anti Ag associé à anti Au d'où les erreurs possibles.

Titrage en I.D.

Par dilutions sériées du sérum, en progression :

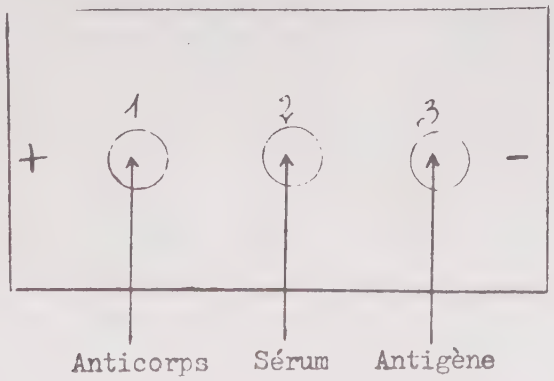
1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/32, 1/40, 1/64, dans le systèmeen ligne défini précédemment, nous évaluons le titre de l'Ag qui correspond à la dernière dilution pour laquelle une ligne de précipitation est observée.

Le dispositif en couronne peut être utilisé pour les titrages étant donné l'économie de sérum anticorps qu'il permet de réaliser, l'Ac étant placé au centre et les dilutions des sérums Ag à la périphérie.

b) **L'électro-immunodiffusion**

Nous l'avons employée pour le dépistage systématique de l'Ag Au. Pesendorfer et collaborateurs (168) ont montré son intérêt pour la détection rapide de l'Ag Au. Elle a été décrite en 1964 par Culliford (61).

Son principe consiste en une migration sous l'influence d'un champ électrique de l'Ag et de l'Ac l'un vers l'autre dans un milieu gélifié (181). Une réaction de précipitation spécifique se produit lorsque les deux réactifs se rencontrent. L'Ag Au, ayant une mobilité α 2 se déplace vers le pôle positif (anode), l'Ac à pH 8,2 - 8,6 migre vers le pôle négatif (cathode). Le puits contenant le sérum à examiner est encadré par deux puits réactifs Ag et Ac, ce qui permet de détecter d'emblée soit l'Ag, soit l'Ac dans un même sérum.

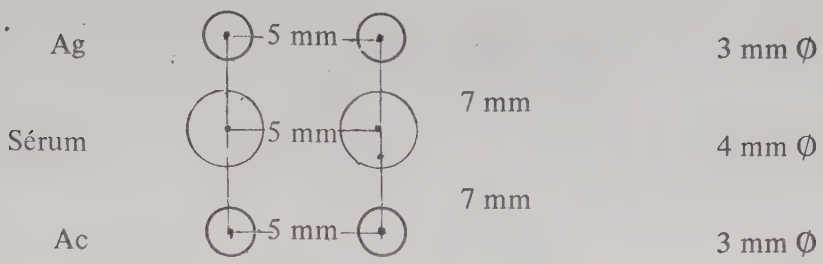


Une ligne de précipitation entre 1 et 2 traduit la présence de l'Ag, alors qu'entre 2 et 3 elle indique au contraire la présence d'un Ac.

Mode opératoire

- Le gel est une agarose à 1 % dans un tampon de molarité 0,13 M composé d'acétate de Na et de véronal sodique ajusté à pH 8,4.
- Ce gel est coulé sur des plaques de verre de 10 x 20 cm, 24 heures à l'avance et conservé en chambre humide.
- Sur ce gel de 2 mm d'épaisseur, des puits de 3 et 4 mm de diamètre sont creusés et aspirés à la pompe à vide.

96 sérums sont ainsi étudiés par plaque suivant le schéma ci-dessous, répété 16 fois par rangée et sur trois rangs.



Les réactifs :

- **Antigène** : c'est un Ag de titre faible (1/2) qui a été croisé au préalable avec 10 Ac de titres variables d'origine humaine.
- **Anticorps**: il est identique à celui utilisé pour l'immunodiffusion simple.

Les quantités de réactifs :

Ac et Ag utilisées sont de 10 à 15 µl par réaction et de 20 à 25 µl pour le sérum étudié.

Les conditions de la migration :

- Les ponts assurant la jonction sont constitués par un double papier Wathman nº 3.
- Une tension de 8 V par cm est appliquée, soit 80 V par plaque, avec une intensité correspondante de 100 à 120 mA.

Dans ce système bien défini, la durée de migration est de 30 mn avec lecture des résultats en éclairage latéral.

La plupart des Ag sont révélés au bout de 30 mn. En fait en 15 à 20 mn, certains arcs de précipitation sont déjà visibles. Un deuxième temps de migration de 30 mn est alors effectué dans les cas d'Ag Au très faible ou d'Ac faible. Puis la plaque est portée en chambre humide 24 h et examinée le lendemain pour la mise en évidence éventuelle des Ac très faibles.

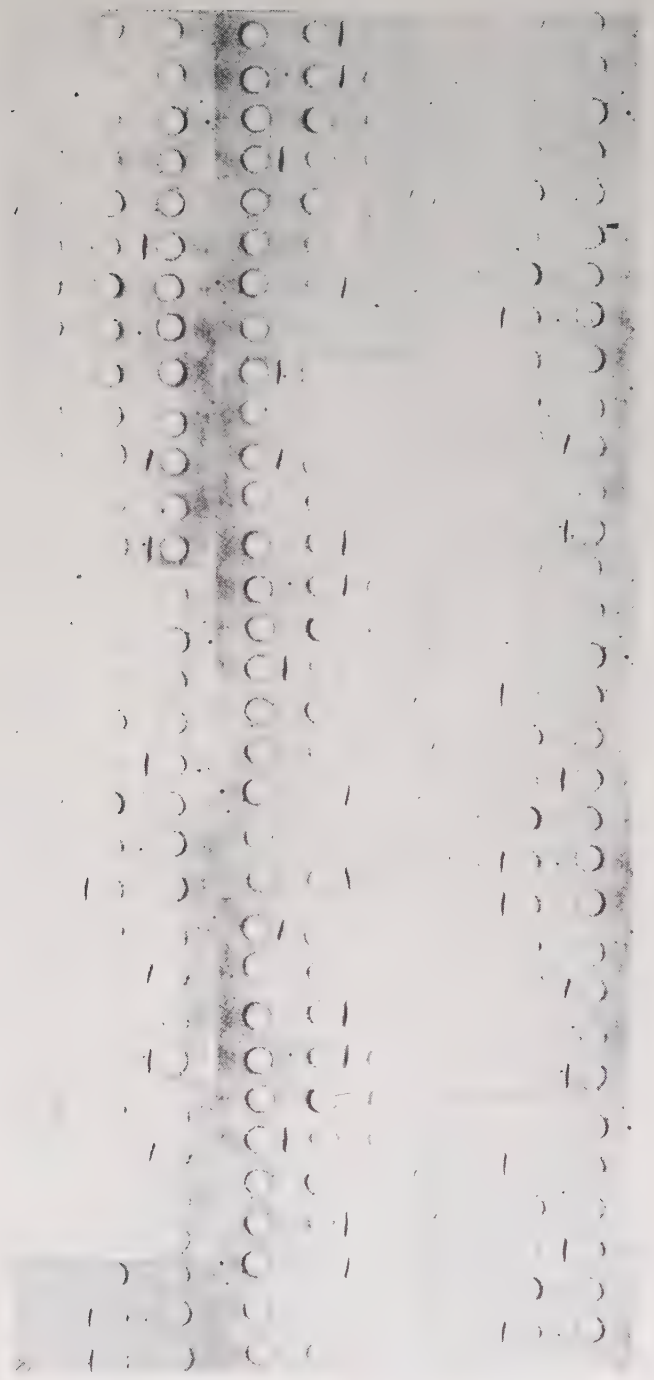


Tableau 1

Exemple de plaque d'Electro-immunodiffusion pour la détection de l'Antigène Australie et de l'Anticorps anti Australie.

3 fois 32 sérums, c'est-à-dire 96 sérums de malades sont étudiés par plaque ; le gel d'agarose à 1 % mesure 2 mm d'épaisseur et les puits sont distants, de centre à centre dans le sens transversal, de 8 mm. les trous ont été effectués un par un à la main, ce qui explique l'irrégularité de leur répartition.

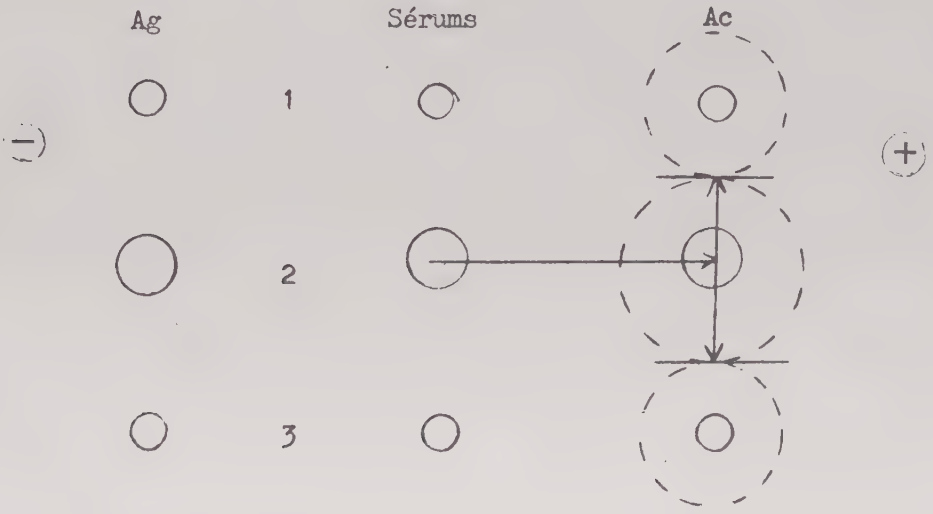
en 1 sérum AgAu + connu
en 2 sérum des malades
en 3 sérum Ac anti Au

Une ligne de précipitation à droite du puits central, traduit la présence de l'AgAu dans le sérum du malade, et inversement à gauche la présence d'un anticorps.

Lecture et interprétation des résultats

La position et la forme de la ligne de précipitation sont assez constantes (tableau 1)

Son déplacement dans le gel en direction de l'Ac s'observe pour des Ag à titres très élevés ; en effet, la ligne de précipitation en 30 mn se déplace jusque dans le puits Ac et l'observation se révèle être négative. Le lendemain, deux lignes latérales apparaissent, témoins de la présence de l'Ag dans le sérum no 2 (cf schéma).



Nous utilisons un Ac dont le titre permet de détecter pratiquement depuis les Ag les plus faibles jusqu'aux titres élevés.

Notre Ag réactif (titre 1/2) permet de détecter les Ac les plus faibles qui sont aussi les plus fréquemment rencontrés. Mais cet Ag ne décèle pas les sérums très riches en Ac, c'est-à-dire que la ligne de précipitation n'est pas nettement visible en 30 mn. Une zone assez large de précipitation, correspondant à la redissolution du complexe par excès d'Ac, apparaît. Il suffit de reprendre la réaction en présence d'un Ag plus concentré.

Détermination du titre de l'Ag Au en E.I.D.

Dans le système d'E.I.D. défini précédemment en utilisant les réactifs Ag et Ac décrits, nous effectuons un titrage des différents Ag par dilutions dans le soluté de chlorure de sodium à 9 ‰ du sérum et observation de l'arc limite formé.

Les progressions des dilutions utilisées sont les suivantes :

1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/ 256

et

1/1, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280

Le titre en Ag correspond à la dernière dilution du sérum pour laquelle un arc de précipitation est encore visible en lumière latérale au bout de 30 minutes.

Intérêt de cette technique

C'est une méthode rapide. En rapprochant les puits à une distance de 6 mm de centre à centre, à 10 V/cm, nous avons pu obtenir des arcs de précipitation en 5^{mn}. Sans doute seuls les Ag très forts sont révélés en 5^{mn} et un temps de 30^{mn} paraît être raisonnable pour la détection des Ag faibles dans le sérum pour le système considéré.

L'E.I.D. est une méthode spécifique et plus sensible que l'I.D. pour deux raisons :

1 - Les schémas suivants permettent de comprendre comment est obtenu ce gain de sensibilité.

Légende : Dans l'E.I.D., toute la quantité de réactif se déplace dans le même sens.

Dans notre système d'E.I.D. bien défini, nous estimons que cette méthode est 4 à 10 fois plussensible que l'I.D. Le gain de sensibilité est en fait plus faible que le laisserait prévoir la théorie.

2 - L'E.I.D., à voltage élevé permet de dissocier les complexes Ag Ac non stabilisés. Nous l'avons constaté et l'intérêt de travailler à 9-10 V/cm, voltage relativement important, est précisément de dissocier ou fractionner les complexes et leur permettre de diffuser.

Toutefois, l'augmentation du voltage est limitée par la résistance du gel à l'échauffement qui risque de provoquer la dénaturation des protéines, ce qui fait apparaître de faux arcs de précipitation. Ceux-ci, en principe disparaissent ou s'atténuent en 24 heures, alors que les arcs dûs aux complexes Ag Ac formés s'intensifient.

Par ailleurs, l'échauffement entraine un dessèchement du gel d'agarose qui peut être entièrement détruit. Pour y remédier, nous avons expérimenté des plateaux refroidisseurs lorsque nous voulions dissocier des complexes immuns mais en fait nous n'empêchons ainsi que très peu le dessèchement du gel.

De fausses réactions positives peuvent apparaître même en travaillant à voltage modéré (7 V/cm). Ces faux arcs s'atténuent en 24 h et proviennent soit de réactifs Ag mal conservés, soit le plus souvent de certaines agaroses présentant des impuretés.

L'E.I.D. se prête à la série puisque sur une plaque de 10 x 20 cm,96 sérums sont étudiés en temps limité.

Les facteurs intervenant dans l'E.I.D.

1° / **L'agarose**

a) **La concentration** du gel utilisé influe directement sur le temps d'apparition et sur la forme des arcs de précipitation.

- au-dessous de 0,8 % . le gel tend à se liquéfier à l'échauffement
  . les puits sont difficiles à creuser
  . la précipitation des arcs est peu nette et se traduit par un flou, mais surtout les phénomènes de zone sont les plus importants.
- au-dessus de 2 % . le temps de migration est nettement allongé
  . le gel est plus résistant et supporte des voltages plus élevés.
  . la précipitation est plus fine mais la technique perd en sensibilité.
- Nous préconisons . un gel de 0,9 à 1,1 % pour le dépistage des Ag et pour le titrage.
  . et 1,5 - 2 % pour l'E.I.D. à voltage élevé aux environs de 15 V/cm ; dans ces conditions les temps de mise sous tension doi-

vent être relativement courts, jamais supérieurs à une demi-heure, l'usage d'un plateau refroidisseur semble indispensable, les puits doivent être distants latéralement d'un système à un autre, d'au moins 1,5 cm pour éviter les échauffements trop importants au niveau des jonctions de gel.

b) **La qualité :**

Il est indispensable d'essayer les agaroses à utiliser et de sélectionner des lots d'agarose* qui ne donnent pas de fausses précipitations.

2°/ **Le tampon**

a/ **Composition** : différentes compositions sont préconisées notamment à base de lactate (181) ; nous l'avons supprimé à cause des fausses précipitations qu'il provoquait à voltage élevé. Le tampon à base d'acétate et de véronal nous donne satisfaction.

b) **le pH** peut être ajusté entre 8,2 et 8,6.

Nous l'utilisons à 8,4 car nous obtenons une meilleure sensibilité pour la détection des Ac.

3°/ Les réactifs

a/ **Le choix** : Il conditionne la sensibilité et la spécificité de cette technique. Chacun doit être croisé contre une gamme d'Ag ou d'Ac de titre et d'avidité variables.

En général, les Ac de titre élevé sont de bons réactifs pour détecter les Ag, mais il arrive que l'on trouve des Ac de bas titre capables de révéler tous les Ag. Ces anticorps sont caractérisés par leur avidité.

b/ **La conservation** : est importante.

Congélation – 20° par petites fractions avec ou sans merseptyl.
La mauvaise conservation engendre pour l'Ag des fausses réactions en série et pour l'Ac une baisse de son titre et de son avidité.

4°/ **Les conditions de la migration**

- Deux variables : voltage et ampérage
Nous avons fait varier le voltage de 5 V/cm à 20 V/cm.
Au-delà des 15 V/cm, l'agarose se détériore, même en utilisant un plateau refroidisseur.

. La vitesse de migration est fonction de la différence de potentiel appliquée aux extrémités du gel, et de l'intensité du courant passant dans l'agarose.

- à 5 V/cm, la précipitation est bonne, mais en 1 heure 1/2 à 2 heures.
- à 7 V/cm, elle s'effectue en 3/4 heure - 1 heure.
- à 8 V/cm, en 30 minutes environ.

L'échauffement de l'agarose nécessite une interruption du courant au bout de ce temps.

L'intensité est fonction des ponts assurant la jonction. Nous en avons expérimentés plusieurs :

En agarose, en acétate de cellulose (cellogel), en éponge, en tissu, en cellulose (papier).

Les jonctions en papier Watman n° 3 en double épaisseur, de manipulation aisée, réutilisables (jusqu'à 5 fois), nous ont donné satisfaction.

* Nous utilisons l'agarose, qualité A 37 testée pour l'Ac Australia de l'Industrie Biologique [illegible]

Nous avons recherché l'intensité maximale qui nous donnait une bonne précipitation dans un temps limité, sans altération des protéines, soit 120 mA pour notre système défini précédemment.

5° / **Dimensions des puits des réactifs et écartement**

Dans le but de sensibiliser et de diminuer le temps de la réaction, nous avons fait varier les distances des puits, de centre à centre, et leurs diamètres.

. Avec des réactifs Ag Ac bien sélectionnés et des puits Ag, Ac de 3 mm de diamètre nous avons augmenté le diamètre du puits central contenant le sérum à étudier de 3 à 6 mm.

Au-dessus de 4 mm, nous n'avons pas obtenu d'élévation notable de la sensibilité.

. En faisant varier les distances des puits de centre à centre, un gain de temps intéressant a été obtenu en les rapprochant jusqu'à la distance minimale de 6 mm.

TECHNIQUES QUANTITATIVES

Méthode de Mancini

. Elle a été adaptée à l'Ag Au par Pesendorfer (209)

. L'Ag Au se déplace dans un gel d'agarose contenant l'anticorps anti Au.
Une ligne de précipitation apparaît au bout de 48 heures et la surface du cercle, limitée par cette ligne, est proportionnelle à la concentration de l'Ag Au.

Méthode de Laurell

. C'est la méthode de choix pour les dosages quantitatifs en immunoprécipitation pour de nombreuses protéines sériques et du L.C.R. Cette technique est tributaire de la force des sérums Ac anti Au dont on dispose et elle doit être adaptée pour chaque dosage.

. Nous avons repris la technique adaptée et décrite par Pesendorfer avec quelques modifications.

- un gel d'agarose à 1,3 % dans le tampon de Laurell.
- 25 ml d'agarose à 50° dans lesquels on ajoute 5 ml d'un Ac titrant 1/32 en Immunodiffusion.
- le gel est coulé sur des plaques de verre de 200 x 100 mm.
- des puits de 4 mm sont creusés, soit 72 trous par plaque (4 rangées de 18 puits).
- ces plaques sont placées dans une cuve à électrophorèse à raison de 50 mA/plaque pendant 4 heures.

. Résultats : La hauteur des pics de précipitation est proportionnelle à la teneur en Ag du sérum.

La méthode de Laurell est plus sensible et rapide que celle de Mancini qui demande 48 h pour avoir les résultats.

2° / LES METHODES METTANT EN JEU L'ACTIVATION DU COMPLEMENT

Suivant les composants du complément mis en cause, deux méthodes sont utilisées.

- La fixation du complément - FC -

Activation de tous les composants du complément et mise en évidence par le système révélateur hémolytique classique : globules rouges de mouton sensibilisés.

- L'Immuno-adhérence - Hémagglutination - I.A. -

Activation des 4 premiers composants du complément C'1,4,2,3 et hémagglutination des globules rouges humains.

a) **Fixation du complément**

Schulman en 1969 l'a appliquée pour la première fois à l'Ag Au et J.P. Soulier presque simultanément en France ; cette technique a été reprise par d'autres auteurs et commence à être utilisée couramment. De nombreuses variantes de détails existent et nous donnerons les modalités opératoires de celle qui est pratiquée au Centre National de Transfusion Sanguine (203).

- **Mode opératoire**
  - La réaction s'effectue sur plaque de Térasaki sous huile de vaseline.
  - Le sérum à étudier est mis à incuber à 37° à trois dilutions : 1/1 ; 1/16 ; 1/256 pour un dépistage et en dilutions sériées pour un titrage, avec un sérum anticorps sélectionné en présence de complément titré au préalable et utilisé sous 4 unités H 50 par ml pendant une heure.
  - Le système hémolytique constitué par des globules rouges de mouton sensibilisés est ajouté et l'incubation a lieu pendant 30 minutes.

- L'absence d'hémolyse (réaction positive) se traduit par un mince anneau rouge dessinant les contours du fond de l'alvéole.
- Une série de dilutions parallèles contenant tous les réactifs, excepté le sérum anticorps, permet d'évaluer le pouvoir anticomplémentaire spontané du sérum. Celui-ci peut être dû à un complexe Ag Ac Au circulant, présent dans le sérum à étudier et activant le complément.

- **Les réactifs**

  - **Volumes :**

    . Sérum malade et sérum anticorps : 1 µl

    . Complément à 4 unités H 50 : 3 µl

    . Globules sensibilisés : 1 µl

  - **Sérum anticorps :**

    . Sérum de malade ou de donneur fixant le complément conservé congelé à – 80° en petites fractions.

  - **Sérum à étudier :**

    . Il doit être séparé le jour même du prélèvement et immédiatement utilisé après avoir été décomplémenté 1/2 heure à 56° ou congelé.

    . Un sérum congelé ne doit pas être décongelé plus d'une fois. Ces précautions sont nécessaires pour éviter le développement d'un pouvoir anticomplémentaire qui serait indépendant de la présence de complexes Ag Ac Au.

  - **Le complément :**

    . Sérum humain de groupe sanguin AB conservé à – 80°.

Intérêt pratique de cette technique et impératifs

- C'est une technique **sensible** (sensibilité conditionnée par le nombre d'unités H50 de C' utilisées), ne nécessitant que des quantités minimales de réactifs ; pour un dépistage à 3 dilutions par sérum, 1 ml de sérum Ac permet d'effectuer plus de 160 réactions.

- **Spécificité**, un problème de spécificité de la réaction paraît se poser puisque l'on travaille avec des sérums Ag et Ac, donc des réactifs non purifiés ; en fait, cette méthode n'a pu être mise en faute au CNTS par l'utilisation de 4 unités H50 de complément dans la réaction, et par l'emploi des réactifs bien sélectionnés.

- **Pouvoir anticomplémentaire des sérums**

Il peut mettre en défaut cette technique mais Shulman a montré que si l'anticomplémentarité est dûe à un complexe circulant Ag Ac Au, elle est annulée par un excès d'Ag Au. Nous verrons par la suite que de tels complexes correspondent à des complexes Ag Ac Au en excès d'Ac.

- **Le choix du sérum anticorps**

Il conditionne la sensibilité et la spécificité. Ce sérum doit être essayé contre un grand nombre d'Ag et capable de tous les révéler ; en général, les Ac précipitants de titre élevé fixent le complément mais les Ac humains précipitants sont rares.

Parmi les Ac fixant le complément, J.P. Soulier a montré que seuls 10 % révélaient tous les Ag. Ces sérums Ac ne doivent pas contenir d'autres Ac, en particulier des anti A immuns qui peuvent fixer le complément et donner de fausses réactions.

Les Ac animaux fixent mal le complément, ce qui limite les sources de réactifs. Il en est de même des sérums Ac purifiés.

b) **Immuno-adhérence - Hémagglutination**

Technique mise au point au Japon par Mayumi (147) et adoptée au CNTS par J.P. Soulier.

- **Principe**

Elle est fondée sur l'emploi d'un système révélateur permettant de mettre en évidence l'activation de 4 composants du complément C' 1, 4, 2, 3.

Nishioka (155) et Linscott ont montré que ces 4 composants sont nécessaires pour l'hémagglutination des GR dans la réaction d'Immuno-adhérence.

Le complexe Ag Au - Ac anti Au - complément (C'1, 4, 2, 3) provoque l'agglutination des globules rouges.

- **Mode opératoire**

. Semi microméthode s'effectuant en trois temps dans des plaques pour microtitration.

1 - Le sérum à étudier est mis en incubation 1 h à 37° à différentes dilutions du 1/8 au 1/1024 et plus, en présence du sérum anticorps.

2 - Le complément en excès est ajouté pendant un temps de contact de 40 mn à 37°.

3 - Puis un réducteur des ponts disulfides ainsi que des globules rouges humains sont additionnés.

. Une réaction positive se traduit par une répartition homogène des hématies ou par un anneau très fin de diamètre plus ou moins large.

- **Réactifs**

Ils sont tous employés sous un volume de 25 µl

- **Le complément :**

. Sérum de cobaye frais ou congelé à – 80° et dilué au 1/100.

- **Système agglutinant :**

. Globules rouges humains O Rh + ou O Rh – dilués à 120 000/mm3, en suspension dans une solution d'EDTA et de tampon véronal albumine à 0,04 molaire.

- Réducteur des ponts disulfides

. Différents corps chimiques peuvent être utilisés ; le mercapto éthanol, ou le B.A.L., ou mieux le Dithiothreitol (ou Dithioérythritol).

Intérêts et inconvénients

C'est une technique très sensible mais elle ne peut pas détecter l'Ag Au sur les sérums dilués de 1/1 à 1/4, étant donné la quantité élevée de l'inhibiteur du C' 3 qui interfère avec la réaction, ce qui explique que les sérums sont étudiés dilués au 1/8 ; les substances réductrices de ponts disulfures sont ajoutées dans le but de diminuer l'activité inhibitrice des sérums vis-à-vis de C' 3 et de rendre la réaction stable.

Elle présente un intérêt par rapport à la fixation du complément : elle n'est pas mise en défaut par les sérums présentant un pouvoir anticomplémentaire dû à des complexes. La sensibilité de ces techniques est à peu près identique mais l'I.A. consomme beaucoup plus de sérum Ac que la fixation du complément.

3° / LA METHODE D'AGREGATION PLAQUETTAIRE

Elle a été mise au point en Finlande (Helsinki) en 1970. (166) (209)

- Principe

. Le complexe Ag Au - Ac anti Au provoque une agrégation des plaquettes qui est observée par sédimentation sur des microplaques.

. De nombreux sérums sont capables d'agréger spontanément les plaquettes, sans apport d'Ag ou d'Ac ; cette constatation permet de penser que la présence de complexes immuns dans ces sérums est responsable de ce phénomène.

. Cette technique est très sensible et détecte aussi bien les Ag que les Ac. Mais elle permet de détecter la présence éventuelle de complexes spontanés dans le sang. L'utilisation de plaquettes et les difficultés de manipulation semblent en limiter son emploi.

4° / TECHNIQUES D'AGGLUTINATION PASSIVE

Elles sont toutes fondées sur la fixation d'anticorps : agglutination directe, ou la fixation d'antigène : agglutination inverse sur des particules dont l'agglutination est visible à l'œil nu (latex, bentonite, globules rouges).

a) Réaction au latex (ou bentonite)

Des particules de latex sensibilisées par un anticorps purifié anti Au ont été expérimentées ; mais la mise au point se poursuit. Plusieurs problèmes doivent être encore résolus, en particulier des phénomènes de zone génants qui nécessitent de nombreuses dilutions du sérum à tester et aussi reste un problème de spécificité.

b) Hémagglutination passive directe ou inverse

Expérimentée par certains, l'hémagglutination passive directe semble manquer de sensibilité et n'est pas utilisée à l'heure actuelle.

L'hémagglutination passive inverse par fixation de l'Ag Au purifié sur des globules rouges à l'aide d'un agent couplant comme le chlorure de chrome est utilisée par Shulman (234). En fait, il s'agit d'une technique d'inhibition de l'hémagglutination.

- Impératifs

Obtention d'un Ag purifié : ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium paraît être la technique de choix.

- Mode opératoire :

- L'Ag purifié obtenu est fixé sur les globules par le chlorure de chrome. Les globules ainsi revêtus sont mis en contact avec des dilutions d'Ac. La dilution limite qui agglutine une quantité donnée de globules correspond à 1 unité agglutinante. On utilise, lors de la réaction, de 2 à 4 unités agglutinantes.

- Le sérum à tester à différentes dilutions est mis au contact de l'Ac, un temps donné. Puis les globules sont ajoutés. L'inhibition de l'hémagglutination, pour une certaine dilution, correspond à une réaction positive.

- Intérêt de cette technique :

Elle est spécifique et présente une très grande sensibilité en hémagglutination directe pour la détermination des Ac et en inhibition de l'hémagglutination pour la détection des Ag.

Techniques se prêtant facilement à une automatisation.

- Inconvénients :

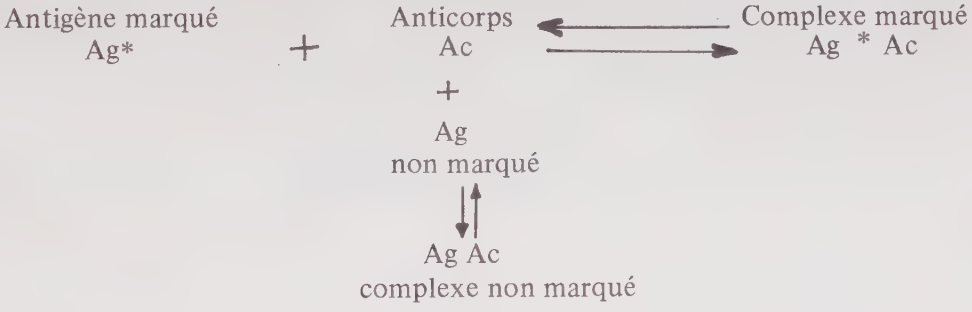
Elle oblige à manipuler des Ag purifiés et les risques de contamination font perdre de l'intérêt pour cette méthode.

L'obtention d'un Ag Au non virulent permettrait de la mettre au premier plan.

5° / METHODE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

Berson et Yalow en 1964 (22) en ont donné les bases théoriques et Walsh et Coll. en 1970 (235) l'ont appliquée à l'Ag Au et à l'Ac anti Au.

- Principe :



L'Ag* s'unit à l'Ac pour donner un complexe * qui par ultracentrifugation est séparé de l'Ag* non lié. La radioactivité du surnageant est mesurée. L'Ag du sérum à étudier entre en compétition avec l'Ag* pour se lier à l'Ac. Ainsi il y aura d'autant plus de radioactivité dans le surnageant que le sérum sera riche en Ag.

- Impératifs techniques :

Il faut obtenir un Ag Au suffisamment purifié pour le marquer par un atome radio-actif (en général on utilise : I^{125} ou I^{131}).

Il faut s'assurer de la spécificité de la réaction et pour cela montrer qu'une proportionnalité existe entre les dilutions du sérum et la quantité d'Ag détecté. Un seuil de détection doit être déterminé.

- Avantages et inconvénients

- Très grande sensibilité de la méthode pour les Ag et les Ac. Elle est spécifique à condition de ne pas aller en-deçà du seuil de détection.

- Difficultés techniques de mises en œuvre et appareillage très couteux.

6° / **IMMUNOFLUORESCENCE**

Millman l'a appliquée le premier pour la localisation d'une antigénicité "Australie" au niveau de coupes effectuées sur les ponctions biopsie de foie et en particulier sur les hépatocytes.

- Principe : Deux méthodes sont appliquées.

1/ Méthode directe : par conjugaison d'un Ac purifié anti Au avec l'isothiocyanate de fluorescéïne et mise en contact avec les coupes de foie. (152)

2/ Méthode indirecte de Coons : qui permet l'emploi d'un Ac non purifié d'origine humaine par contact avec les coupes de foie, lavage et action d'un anticorps antiglobuline marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (190).

Ces méthodes ont permis de mettre en évidence une fluorescence au niveau du noyau et au niveau du cytoplasme des hépatocytes.

- Application au sérum :

Cette technique semble applicable au sérum de malades contenant l'Ag Au pour la mise en évidence des complexes. En effet, nous verrons plus loin qu'ils peuvent mesurer jusqu'à 2 µ de diamètre et plus, donc visibles en mieroscopie optique et en fluorescence. A notre connaissance personne ne l'a encore expérimentée.

- Intérêt de l'immunofluorescence

Millman qui l'a appliquée à de nombreux cas prétend qu'elle serait plus sensible pour la mise en évidence de la contamination virale que la détection de l'Ag Au dans le sang. En effet, il montre que dans certains cas d'hépatite l'Ag Au n'est pas détecté dans le sang par les techniques habituelles. Mais l'immunofluorescence permet de localiser l'Ag Au au niveau des hépatocytes.

Cette méthode reste quand même difficile à réaliser parce qu'elle nécessite une ponction biopsie, et ne peut donc être généralisée.

ETUDE COMPAREE DES METHODES IMMUNOLOGIQUES UTILISEES - LEUR APPORT DANS LA CONNAISSANCE DE L'AG AU CIRCULANT.

Plan

1° / **Critères servant à cette étude comparative**

a/ Réalisation technique :

. Facilité d'exécution
. Le matériel
. Les difficultés techniques :
  - obtention des réactifs
  - purification des Ag et Ac.

b/ Sensibilité et spécificité

c/ Rapidité de la technique

d/ Réalisation en série - automatisation

e/ Aspect quantitatif et détermination du titre.

2°/ **Apport de ces techniques dans la connaissance de l'Ag Au circulant.**

1°/ CRITERES SERVANT A CETTE ETUDE COMPARATIVE

a/ La réalisation technique

- facile pour l'I.D.,l'E.I.D.,avec un appareillage limité. Les réactifs utilisés sont les sérums Ag ou Ac.

- plus délicate pour la fixation du complément et surtout l'immuno-adhérence ; ne nécessite pas de matériels particuliers, mais demande une minutie et une rigueur dans son exécution.

- complexe et appareillage très couteux, de maniement difficile, pour le dosage radio-immunologique, dont l'emploi reste limité seulement à des laboratoires très spécialisés. Problèmes de purification poussée des Ag, ainsi que leur manipulation, de marquage et détermination de seuil de détection.

b/ Spécificité - sensibilité

- La technique de référence reste l'I.D., la moins sensible mais spécifique car elle permet de montrer l'identité entre les lignes de précipitation données par l'Ag étudié et l'Ag de référence.

- L'E.I.D. est de 4 à 10 fois plus sensible que l'I.D. dans notre système considéré. Elle est spécifique par réaction possible en identité en rapprochant les puits réactifs mais certains arcs douteux devront être contrôlés par d'autres techniques.

- Quant à la fixation du complément, la sensibilité est légèrement supérieure à l'E.I.D. avec 4 unités H50 de complément. Dans ces conditions elle reste spécifique, mais elle n'est pas utilisée au maximum de sa sensibilité. Elle nécessite des Ac bien choisis, fixant le complément et capables de révéler tous les Ag Au.

- L'Immuno-adhérence serait légèrement plus sensible que la F.C. car non génée par le pouvoir anticomplémentaire des sérums.

- Le dosage radio-immunologique est beaucoup plus sensible, environ 50 à 100 fois plus que l'I.D. mais pose un problème de spécificité et il est indispensable d'établir un seuil de détection.

- L'hémagglutination passive inverse serait aussi sensible que le R.I.A.

c/ Rapidité de la réaction

- 18 à 72 h pour l'I.D.
- 30 à 60^{mn} pour l'E.I.D.
- 2 h 30 pour la fixation du complément
- 3 h 30 pour l'I.A.
- 2 jours pour le dosage radio-immunologique

d/ Réalisation en série - Automatisation

- Un impératif se pose pour tous les Centres de Transfusion Sanguine, principalement : la détection systématique chez tous les donneurs de sang, sur les flacons de sang, sur le

plasma, sur les fractions plasmatiques (en particulier, dans le fibrinogène) de l'Ag Au. Cette détection est devenue obligatoire depuis le 7 décembre 1971. D'où l'intérêt d'une technique qui se prête à la série ou à l'automatisation.

- L'E.I.D., par sa facilité de mise en œuvre, est la méthode qui semble être, actuellement, la plus favorable. Elle peut être partiellement automatisée.

- Les techniques comme la fixation du complément et l'immuno-adhérence plus sensibles ont été automatisées dans quelques laboratoires. Mais leur diffusion reste limitée à cause des difficultés de réalisation pratique.

La réalisation en série et l'automatisation de l'hémagglutination passive paraît être une méthode d'avenir. L'appareil du type "Groupamatic" répond à ce type de réaction.

Un des problèmes essentiels qui dirige la mise au point de méthodes automatisées reste celui du réactif anticorps à cause de sa rareté, surtout pour ceux qui fixent le complément.

e/ Aspect quantitatif et semi-quantitatif (détermination des titres).

L'aspect purement quantitatif des techniques de Mancini et de Laurell n'apporte pas d'éléments d'information supplémentaire et une estimation quantitative représentée par le titre en Ag d'un sérum paraît suffisante. Aussi, nous préconisons comme méthode l'E.I.D. avec dilutions sériées, méthode rapide, plus souple que celle de Laurell et aussi sensible, reproductible.

Nous avons pu trouver des Ag titrant en E.I.D. 1/1280ème et des Ac au 1/128ème Les quantités de sérum utilisées sont assez limitées pour chaque titrage, suivant l'aspect des arcs de précipitation au cours du dépistage et leur temps d'apparition, on peut d'emblée diluer le sérum au 1/10 ; ainsi nous utilisons environ 80 µl pour chaque détermination de titre d'Ag.

Comparativement, en fixation du complément, un titrage demande en moyenne 30 µl d'immun-sérum.

2° / APPORTS DE CES TECHNIQUES DANS LA CONNAISSANCE DE L'AG AU CIRCULANT

Ils sont de deux ordres :

- **Aspect quantitatif**

Ces techniques permettent d'apprécier l'importance de la libération de l'Ag Au dans le sang et de montrer une certaine "unité de base" de l'antigène Au.

- **Aspect qualitatif**

Des dissociations dans les titres de l'Ag Au par des techniques comme l'I.D., l'E.I.D. et la fixation du complément sont de bons arguments pour la répartition hétérogène de l'Ag Au, c'est-à-dire la présence dans le sang de ce dernier sous forme de complexes immuns en totalité ou en partie.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La microscopie électronique a été appliquée à l'étude de l'Ag Au par Bayer et collaborateurs en 1968. Depuis cette date,quelques équipes ont utilisé ce procédé pour étudier la morphologie de l'Ag Au circulant.

1 - PRINCIPE

Il consiste à effectuer une "coloration" négative de l'Ag Au présent dans le sérum ou le plasma de différents sujets et à examiner ces colorations au microscope électronique. (41)

Les "colorants négatifs" employés se fixent sur les protéines ; aussi est-il indispensable d'éliminer ces dernières en purifiant l'Ag Au.

Les premières préparations enrichies de l'Ag Au l'ont été par ultracentrifugation zonale sur gradient de saccharose à 10 - 30 % et sur gradient de chlorure de Césium. La densité moyenne de l'Ag Au purifié étant aux environs de 1,20 - 1,24, il est logique de le concentrer par gravitation.

Les centrifugations sur gradient de chlorure de Césium, si elles ont permis une purification poussée, altéraient la morphologie de l'Ag Au et en particulier la fragmentaient (74).

Les premières techniques (21) ajoutaient un anticorps anti Au (animal ou humain) au sérum dans le but d'agréger les particules et de favoriser leur gravitation. L'intérêt de cette méthode était d'augmenter la sensibilité de détection, mais des renseignements précieux sur l'état de l'Ag dans la circulation pouvaient être perdus.

Des purifications effectuées par ultracentrifugation à très grande vitesse (150 et 200 000 g) ont été pratiquées aussi afin d'accroître encore la sensibilité. Mais les risques d'altérer la morphologie des particules présentes augmentent et en particulier de désagréger les complexes.

Dans le but d'utiliser la microscopie électronique comme moyen de détection de l'Ag Au dans le sang, et pour étudier sa morphologie, nous utilisons une technique de purification simplifiée, avec centrifugation à vitesse modérée.

2 - MODE OPERATOIRE

1° / **Le sérum** est soumis à trois centrifugations successives. Le culot de centrifugation est repris par un "colorant" et déposé sur une grille qui est examinée.

2° / **La centrifugation :**

Les sérums sont décongelés juste avant leur traitement. 1 ml est mis à centrifuger pendant 30 minutes à 2.500 t/mn dans le rotor SW 50 de la centrifugeuse réfrigérée Spinco L. Six sérums sont ainsi traités à la fois.

Le surnageant est dilué au 1/2 avec un tampon à pH 7,2 - 7,4 (0,1 M) et centrifugé pendant 1 heure à 20 000 t/mn dans le rotor SW 50 ; puis le culot est repris par 2 ml de cette même solution tamponnée. Une nouvelle centrifugation, une heure à 20 000 t/mn dans le rotor SW 50, permet d'obtenir un nouveau culot qui est alors repris par 0,05 ml d'eau distillée.

3° / **Coloration :**

Un volume égal de "colorant" (0,05 ml) est ajouté directement dans le tube de centrifugation pendant un temps de contact de 5 minutes à la température du laboratoire.

4° / **Les colorants :**

Nous employons le phosphotungstate de sodium à 3 % et à pH 6,8 - 7 ; nous avons utilisé au début, parallèlement, le molybdate d'ammonium à 2 % à pH 6,05 et nous avons effectué quelques essais de coloration positive à l'acétate d'urane à 5 % et à pH 5.

5° / **La préparation des grilles**

Des grilles de 400 mesh sont préalablement recouvertes d'un film de parlodion à 0,5 % et carbonées (une reproductibilité de préparation des grilles a été recherchée).

Des gouttes de mélange culot-colorant sont déposées sur une plaque de cire et les grilles sont appliquées sur les gouttes. Après 5 minutes, celles-ci sont égouttées sur du papier filtre et sont ensuite conservées 24 heures à la température du laboratoire et à l'abri de la poussière avant d'être observées.

Cinq grilles sont préparées pour chacun des culots de centrifugation correspondant à 1 ml de sérum.

Nous constatons une bonne amélioration des structures en remplaçant l'eau distillée qui sert à la remise en suspension des culots de centrifugation par une solution d'acétate d'ammonium à 1 %.

3 - LE MICROSCOPE

De marque Siemens (Elmiscop) ; nous travaillons en faisceau fin avec double condenseur sous une tension de 80.000 V. Les grossissements utilisés varient de 50.000 à 80.000 (les photos sont prises pour la plupart à 60.000 et dans certains cas d'étude structurale à 80.000).

4 - L'EXAMEN MICROSCOPIQUE

Les grilles sèches sont examinées à raison de 5 par sérum. Nous faisons une observation basée sur différents critères :

- la présence ou l'absence de particules d'Ag Au.
- la répartition de ces particules sur les grilles.
- leur morphologie
- et nous effectuons une estimation quantitative par champ, par plage, ou par grille et un pourcentage approximatif des particules les unes par rapport aux autres.

CORRÉLATION ENTRE LA CLINIQUE, L'ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE ET LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE L'ANTIGENE AUSTRALIE

Plan Pages

I - **RENSEIGNEMENTS CLINIQUES INDISPENSABLES** 30

1°/ Les antécédents du sujet.
2°/ Son origine ethnique et géographique.
3°/ La date d'apparition de l'ictère.
4°/ Le diagnostic clinique.
5°/ Le traitement au moment du prélèvement.
6°/ Le bilan biologique.

II - **OBJECTIFS de cette ETUDE** 31

III - **Les CAS CLINIQUES** 31

1°/ Un cas de leucémie aiguë myéloblastique 31
2°/ Leucémies : 41

- 2 L.A.M. (Leucémies aiguës myéloblastiques)
- 1 L.L.C. (Leucémie lymphoïde chronique, qui a évolué en un syndrôme de Richter)
- 1 leucémie dont nous n'avons pu connaître le type, le dossier ayant été égaré.

3°/ 2 hémodialysés 49
4°/ 4 transplantés rénaux 53
5°/ 2 collagénoses 57

- 1 périartérite noueuse (P.A.N.)
- 1 maladie de Kaposi.

6°/ 3 cas d'hépatites chroniques 68
7°/ 3 cas de cirrhose 87
8°/ Hépatites aiguës "banales" 88
9°/ Porteurs sains 93
10°/ Hépatites avec anticorps 95

Le dépistage systématique de l'Ag Au sur tous les prélèvements de sang en provenance de différents services de médecine et de chirurgie a été effectué au laboratoire sur plus de 4.000 sérums.

Par la technique d'E.I.D., nous avons trouvé près de 140 sérums Ag Au + et 20 Ac anti Au. Tous ces sérums Ag Au + nous ont servi de matériel de travail et nous avons pu confirmer la présence de l'Ag et en compléter son étude par d'autres techniques immunologiques et par la microscopie électronique.

Les cas de sujets dont l'examen du sérum a pu être réalisé de manière suffisamment complète et pour qui nous avons eu des données cliniques suffisantes pour pouvoir présenter un intérêt sont rapportés dans ce travail.

I - RENSEIGNEMENTS CLINIQUES INDISPENSABLES

Parmi les données concernant les sujets porteurs de l'Ag Au, nous retenons certains renseignements intéressants à connaître en totalité ou en partie afin d'établir des corrélations dans la pathogénie de l'Ag Au.

1° / Les antécédents

- hépatite ou ictère antérieur
- transfusions reçues, de sang total, de plasma ou de fractions plasmatiques.
- séries d'injections médicamenteuses.
- interventions chirurgicales.
- ictères dans l'entourage.
- traitement subits, en particulier corticoïdes ou toute substance douée de propriétés immunosuppressives.

Ces données permettent d'émettre les hypothèses les plus probables quant à l'origine, le mode de contamination et la date de pénétration dans l'organisme du virus de l'hépatite.

2° / L'origine ethnique et géographique du sujet :

Dans le but de savoir si ce dernier demeurait ou revenait d'une zone d' "endémie à Ag Au".

3° / La date d'apparition de l'ictère et les premiers symptômes de l'hépatite.

4° / Le diagnostic clinique

a) Hépatite : aiguë, prolongée, chronique, chronique active, grave, médicamenteuse.
Dans le but de voir s'il y a une relation entre l'Ag Au et le déclenchement d'une hépatite, son évolution normale, sa prolongation ou son passage à la chronocité.

b) Cirrhose : éthylisme ou étiologie envisagée.

c) Atteintes rénales, articulaires, vasculaires, collagénoses :
L'Ag Au a-t-il un rôle dans le déclenchement de ces affections ?

d) Hémopathies :
Intérêt de l'étude des hépatites ictériques ou anictériques au cours des hémopathies malignes souvent polytransfusées et traitées par des cytostatiques à propriétés immunosuppressives.

5° / Le traitement au moment du prélèvement

Corticoïdes (dose), Immunodépresseurs (dose), Transfusions.
Pour voir leur influence éventuelle sur l'état et la morphologie de l'Ag Au dans le sang.

6° / **Le bilan biologique** : limité à quelques examens :

a) - transaminases (SGOT et SGPT) en Unités Frankel
- bilirubine
- réactions de floculation

Ces trois épreuves permettant de voir s'il existe une corrélation entre la quantité d'Ag libéré dans la circulation et le degré de perturbation des constantes biologiques.

b) - la ponction biopsie du foie : afin d'apprécier l'état d'inflammation, de cytolyse de stéatose, de sclérose hépatique en relation avec l'Ag Au.

II - OBJECTIFS de cette ETUDE

1° / Le but initial qui a guidé le dépistage systématique de l'Ag Au sur tous les sérums était l'obtention de prélèvements de sang à des temps qui correspondent à la phase prodromique ou au début de la phase ictérique ou anictérique d'une hépatite.

Nous pensions ainsi pouvoir mettre en évidence dans ces prélèvements de sang précoces des structures qui correspondent au virus de l'hépatite. Cette recherche est basée sur les travaux de Mella et Willems et Collaborateurs (150 - 151 - 237) et sur les observations suivant lesquelles les virus "complets" apparaissent au début de l'affection et très vite après, les formes anarchiques incomplètes du virus sont libérées par la cellule, fait qui a été remarqué en particulier pour le virus de la grippe.

2° / Nous voulions étudier l'apparition chronologique de l'Ag Au dans le sang au cours d'une hépatite et suivre surtout sa libération par la cellule et sa morphologie au moment de l'hépatolyse.

3° / La morphologie de l'Ag Au dans le sang est-elle liée à certaines pathologies et quelle est la pathogénie éventuelle de l'Ag Au ?

4° / Enfin, nous voulions suivre l'apparition et l'augmentation de titre de l'Ac anti Au.

III - Les CAS CLINIQUES

Un cas, particulièrement intéressant, est rapporté en détail car il nous a servi de base et a orienté nos recherches. D'autres observations fragmentaires seront décrites ensuite à cause des informations supplémentaires qu'elles permettent d'apporter et nous les avons groupées par entité clinique.

Nous ne suivrons pas l'ordre logique qui voudrait commencer par les hépatites banales, car les autres cas permettent de donner une interprétation plausible à ces dernières quant aux aspects rencontrés.

1° / LEUCEMIE AIGUE MYELOBLASTIQUE (L.A.M.)

a) **Histoire de la maladie**

Monsieur RAM, 36 ans, est sans antécédents pathologiques lorsqu'apparaît en Octobre 1970 une angine traînante et un panaris torpide.

Une première numération faite à cette date montre une anémie modérée et une leucocytose à 24.000 avec 30 % d'éléments myéloblastiques.

En novembre 1970, le diagnostic de L.A.M. est posé ; le sang périphérique contient 120.000 leucocytes dont 91 % éléments myéloblastiques et le malade présente une hépato-splénomégalie.

Le myélogramme confirme l'envahissement myéloblastique (95 %). Le malade est **transfusé** et reçoit une cure de **Rubidomycine** en Décembre 1970 (160 mg). L'effet du traitement est immédiat, cependant une période d'aplasie médullaire suit cette cure. Le sujet est mis sous antibiothérapie intensive à cause d'une fièvre persistante (Rifamycine).

Le 17 Décembre apparaît un ictère avec des transaminases et phosphatases subnormales. La Rifamycine est interrompue et l'ictère commence à regresser dans les 48 h pour disparaître dans les cinq jours. La réapparition des "blastes" fait faire une deuxième puis une troisième cure de Rubidomycine. Le malade quitte le service en janvier 1971 avec une formule sanguine normale. Il reçoit un traitement d'entretien de 2 comprimés de 6 Mercaptopurine par jour et 5 mg de métotrexate par semaine.

En Février 1971, le malade est réhospitalisé pour une rechute de sa L.A.M. et traité par la L. asparaginase puis la Rubidomycine.

Le 19 Février, un nouvel ictère apparaît avec augmentation des transaminases. La chimiothérapie est maintenue. L'ictère régresse et les transaminases diminuent pour redevenir sensiblement normales le 8 Mars.

Le malade quitte le service dans un état désespéré (leucopénie à 800 - envahissement médullaire et du LCR). Il devait décéder durant son transport.

b) **Examens biologiques effectués**

Ils permettent de constater que le malade a fait un premier ictère médicamenteux, avec bilirubine totale à 98 mg et conjugée à 66, et transaminases et phosphatases subnormales ; l'arrêt de la Rifamycine a entraîné un retour à la normale des examens biologiques en cinq jours.

Un deuxième ictère avec transaminases augmentées (SGPT et SGOT à 110 U.), bilirubine totale 65 et conjugée à 9, est apparu le 19 Février avec retour progressif à la normale des transaminases et bilirubine en 20 jours, la chimiothérapie n'ayant pas été interrompue (tabl. 3)

c) **Résultats des tests immunologiques et en microscopie électronique**

- 8 prélèvements échelonnés depuis le mois de Décembre jusqu'au mois de mars ont été obtenus et le sérum a été congelé.
- Rétrospectivement, nous avons pu effectuer la recherche de l'Ag Au et le titrage par 5 techniques immunologiques.
- Les résultats sont rapportés dans le tableau nº 2 qui nous montre :

  . le 17 Décembre : une recherche de Ag Au – par E.I.D. et I.D. mais toutes les autres techniques n'ont pu être réalisées, le prélèvement ayant été perdu.

  . le 23 Décembre : le sérum est positif en Ag Au par le dosage radio immunologique ; négatif par toutes les autres techniques, mais la FC permet de révéler un pouvoir **anticomplémentaire** du sérum.

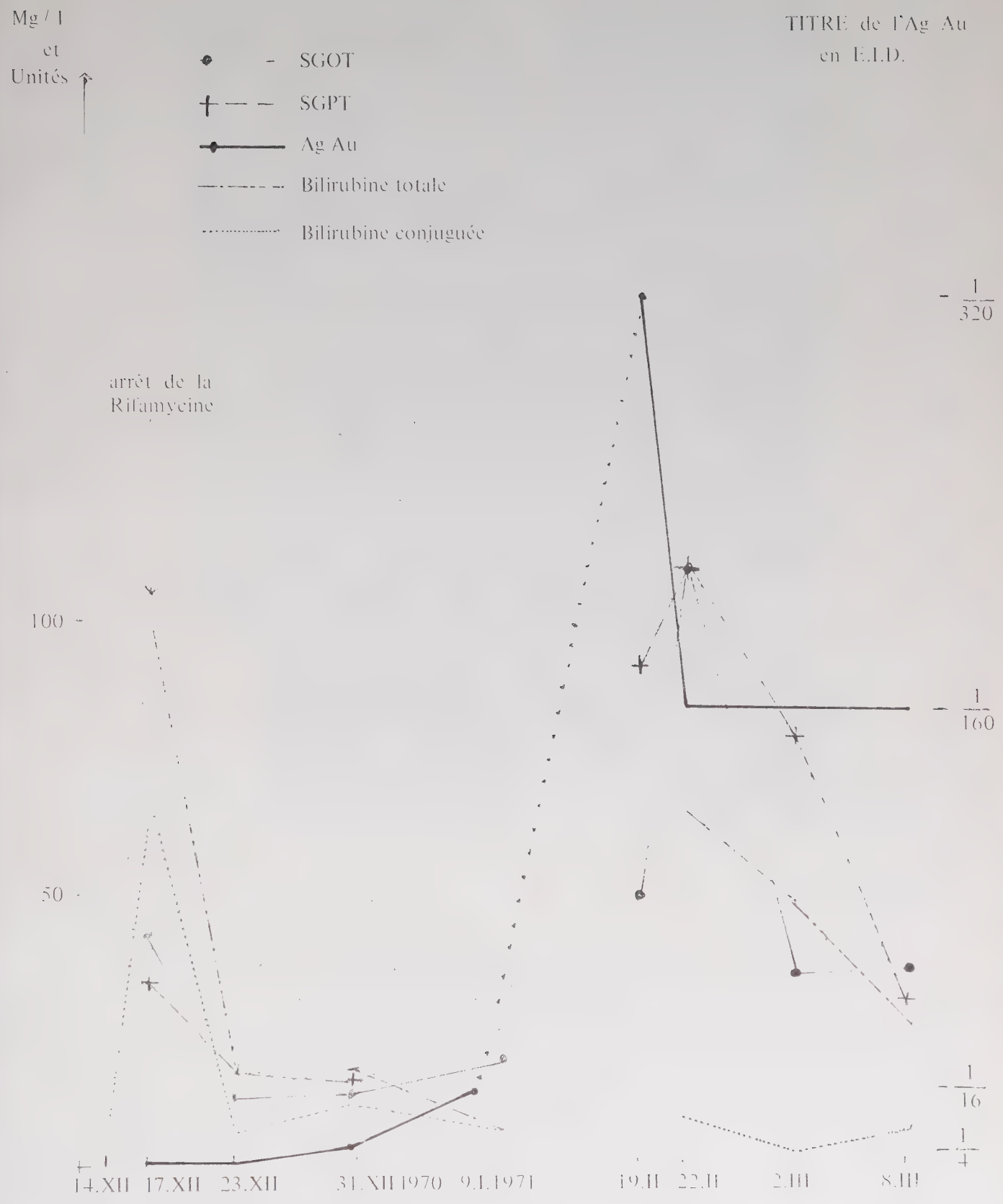
TABLEAU 2

N[os] des sérums		40	46	50	55	100	103	109	114
Date des prélèvements		17/12/70	23/12/70	31/12/70	9/1/71	19/2/71	22/2/71	2/3/71	8/3/71
ANTIGENE AUSTRALIE	Immuno-diffusion	—	—	+≤ 1/1	+ 1/1	+ 1/24	+ 1/20	+ 1/16	+ 1/16
	Electro-Immuno-diffusion	—	—	+ 1/4	+ 1/16	+ 1/320	+ 1/160	+ 1/160	+ 1/160
	Fixation du complément		anti-complémentaire	anti-complémentaire	+++ 1/16	++++ 1/512	++++ 1/256	++++ 1/256	++++ 1/64
	Immuno-adhérence		—	+++ 1/64	++ 1/1024	++++ 1/4096	+ 1/4096	+ 1/4096	+ 1/4096
	Dosage radio-immunologique		+ 1/50	+	+	+	+	+	+
Anticorps			—	—	—	—	—	—	—
Particules en cocarde 38 nm	Isolées		1 pour 4 grilles	1-3/c.m.	5-15/c.m.	10/20/c.m.	10-15/c.m.	3-10/c.m.	4-8/c.m.
	Agrégées		5-20 amas de 3-22/ grilles	5-10 amas de 2-3/ grilles	—	—	—	—	—
Particules rondes de 15 nm			—	—	5-20/ c.m.	300-400/c.m.	200-400/c.m.	200-500/c.m.	300-500/c.m.
Particules tubulaires			—	—	—	25/grilles	30/grilles	1/4/c.m.	2-5/c.m.

L'évaluation du nombre des particules virales en microscopie électronique a été faite à un grossissement de 60.000 et à 60 KV d'accélération.
(c.m. : champ microscopique)

M. R.A.M. - Leucémie aigue myéloblastique sous polychimiothérapie

TABLEAU 3



Légende : M. RAM - L.A.M. - Hépatite ictérique avec Ag Au - diagramme des constantes biologiques.

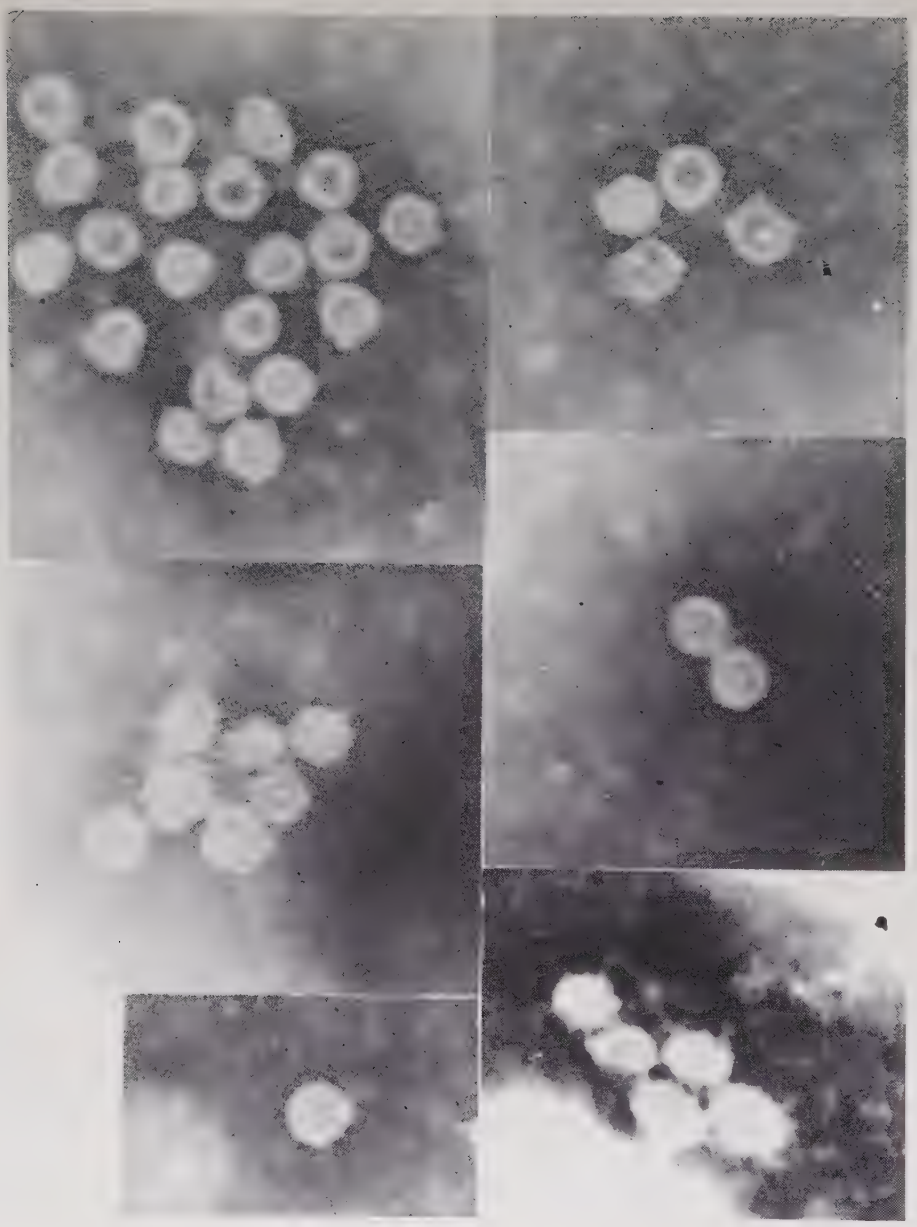


Planche I M. RAM. Leucémie aigüe myéloblastique. sérum du 23/12/70
2 mois environ avant une hépatite avec Ag Au.

Coloration négative au molybdate d'ammonium à 2 %
grossissement : 220.000

La recherche de l'Ag Au est positive par le dosage radio-immunologique et le sérum est anti-complémentaire. Les particules en cocarde sont toutes agrégées entre elles et on remarque les ponts filamenteux qui les relient.

Les formes classiquement décrites de l'AgAu (rondes et en bâtonnets) sont absentes.

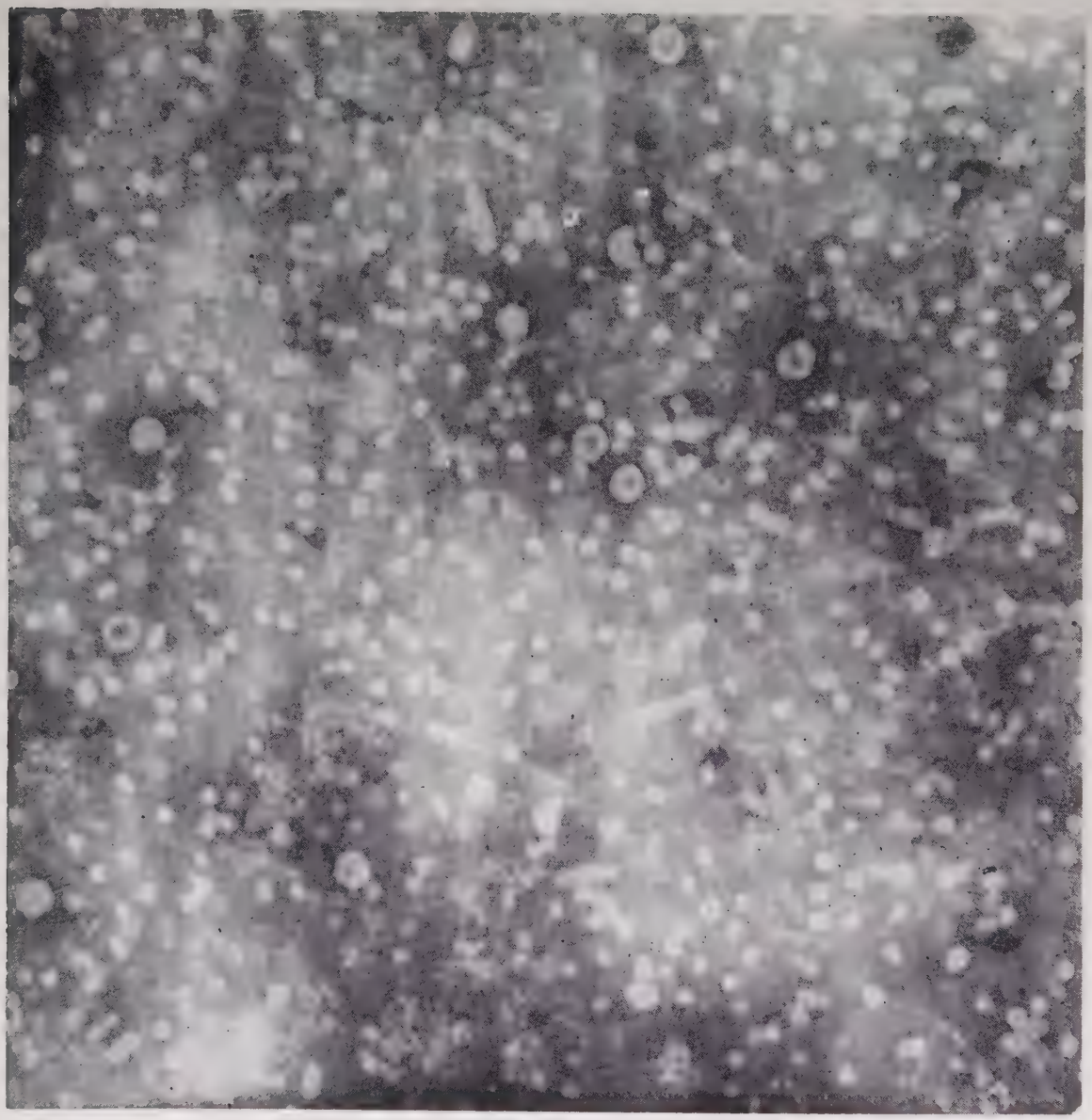


Planche 2 M. RAM. L.A.M. sérum du 19/2/71 (n° 100)
transaminases (sGOT et sGPT) à 100 u
traité par l'Asparaginase et Rubidomycine.

Coloration négative au molybdate d'ammonium à 2 %
Grossissement : 134.000

La recherche de l'AgAu est positive par toutes les techniques (1/320 en E.I.D.)
Les particules sont dispersées ; les formes rondes sont en majorité, sensiblement identiques en dimension et forme.

La microscopie électronique montre la présence de particules agrégées par groupes de 3, 6, 7, 15, 16 et 22 à raison de 5 à 20 agrégats par grille.

10 grilles ont pu être examinées pour ce sérum. Ces particules ont un aspect en cocarde constituées par une double enveloppe avec un centre plein ou vide. Leur dimension varie de 36 à 38 nm.

L'examen de 10 grilles (5 au molybdate, 5 au phosphotungstate) permet de conclure à l'absence totale d'autres types de particules.

Le prélèvement du 31 Décembre est positif en I.D. (limite après recharge) en E.I.D., en I.A., mais toujours anticomplémentaire en F.C. et les particules en cocarde sont toujours en agrégat avec quelques formes libres et absence d'autres types de particules.

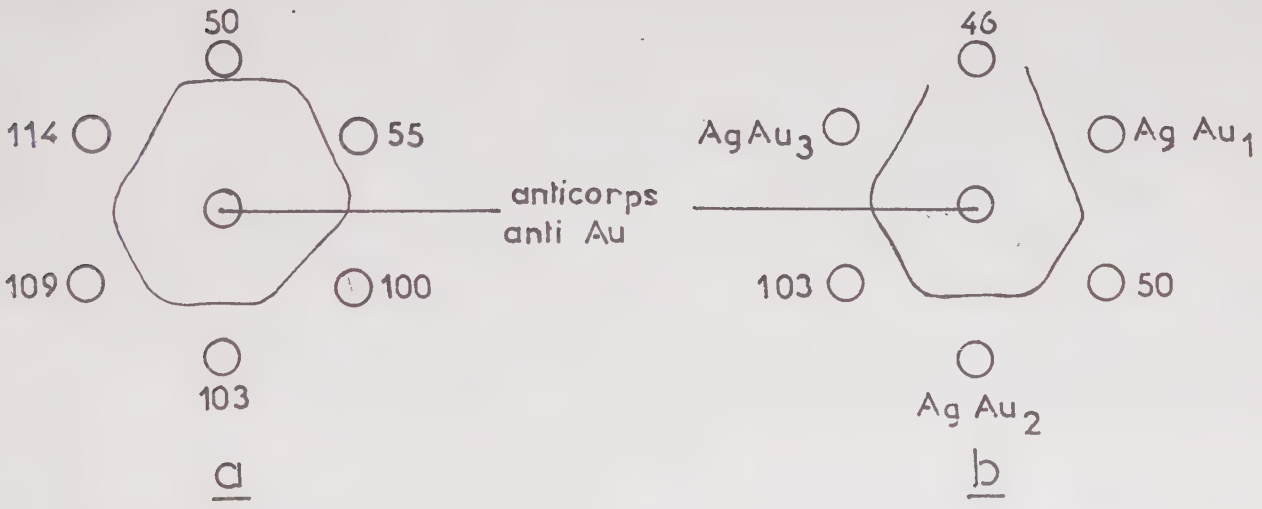
Le 9 Janvier, le sérum est positif par toutes les techniques, avec un titre croissant. La F.C. est positive et les particules en cocarde, toujours présentes, sont augmentées en nombre mais dispersées. Des particules de plus petite taille, rondes, toutes identiques en dimension (16 nanomètres) et en forme sont observées pour la première fois.

Le 2 Février, à côté des cocardes et des petites particules présentes, nous remarquons l'apparition de formes allongées, en "bâtonnet " qui semblent constituées par l'accolement de 2 à 3 particules rondes.

Du 22 Février au 8 Mars, (dernier prélèvement qui a pu être étudié), le titre de l'Ag Au se maintient à un niveau sensiblement constant. Le nombre de particules rondes augmente, puis se stabilise ainsi que celui des bâtonnets. Par contre, le nombre de cocardes diminue en pourcentage.

d) **Etude immunologique complémentaire des sérums**

Nous avons croisé les différents sérums avec un Ac anti Au suivant les schémas ci-dessous :



Légende : les 6 prélèvements sont croisés vis à vis d'un même anticorps

3 sérums sont intercalés avec des sérums Ag Au connus d'origines variées.

Cette étude nous permet de constater que les différents sérums contenant des types particulaires bien définis ont des Ag Au immunologiquement non différenciables. Le sérum 50, qui ne contient que des particules en cocarde, est en identité avec les sérums 114 et 55 contenant respectivement 3 et 2 types de particules et avec les Ag Au $_1$ et Ag Au $_2$.

e) Apport de cette observation

Les renseignements acquis grâce à cette observation nous permettent de tirer des conclusions de différents ordres :

1° / **Ordre technique :**

- sensibilité comparative des techniques immunologiques
  - Le dosage radioimmunologique est la technique la plus sensible au même titre que la microscopie électronique car il permet d'identifier l'Ag Au dans le sang 8 jours avant les autres méthodes.
  - L'I.A. et l'E.I.D. n'ont pas permis de déceler l'Ag Au dans le sang plus précocément que l'I.D.

  Cette constatation est importante et permet de voir que la comparaison des sensibilités de technique par dilution sur un même sérum ne reflète pas exactement la sensibilité réelle de détection de l'Ag Au dans la dynamique de libération de ce dernier.

- Il est intéressant de considérer que les sérums des 23 et 31 Décembre 1970 sont anticomplémentaires et que les particules d'Ag Au observées dans ces mêmes sérums sont agrégées entre elles. L'examen minutieux de ces particules permet de penser qu'elles sont liées les unes aux autres par un anticorps qui se manifeste sous forme d'un feutrage masquant les structures ou sous forme d'un fin filament assurant la jonction entre les particules. Ces structures ressemblent à des molécules d'Ig G, les 2 fragments Fab liant les particules et le fragment Fc restant libre. (Planche 3)

  Le pouvoir anticomplémentaire des sérums disparaît à partir du 9 Janvier 1971 où apparaît seulement une positivité en FC.

  Il semble logique de penser que ces particules agrégées représentent des complexes Ag Au-Ac anti Au immuns, c'est-à-dire qui ont fixé le complément.

2° / **Ordre morphologique**

- Les particules en cocarde apparaissent les premières ; elles sont toutes agrégées entre elles et cela 2 mois avant le 2ème ictère.
- Les petites particules sphériques apparaissent plus tardivement puis les bâtonnets qui semblent constitués par une juxtaposition de petites particules.

  Différents travaux (150 - 151 - 237) montrent que les sérums de malades atteints d'hépatite en phase pré-ictérique et au début de la phase ictérique inhibent la transformation lymphoblastique par la phytohémagglutinine et que les virus à ADN et ARN mis à incuber avec des cultures de lymphocytes, en présence de PHA, inhibent la transformation lymphoblastique.

  Ceci suggère que les particules en cocarde trouvées seules dans le sang de ce malade pendant la phase pré-ictérique correspondent au virus de l'hépatite. Les formes sphériques et les bâtonnets ne représenteraient que du matériel "lipoprotéique" viral produit anarchiquement par la cellule.

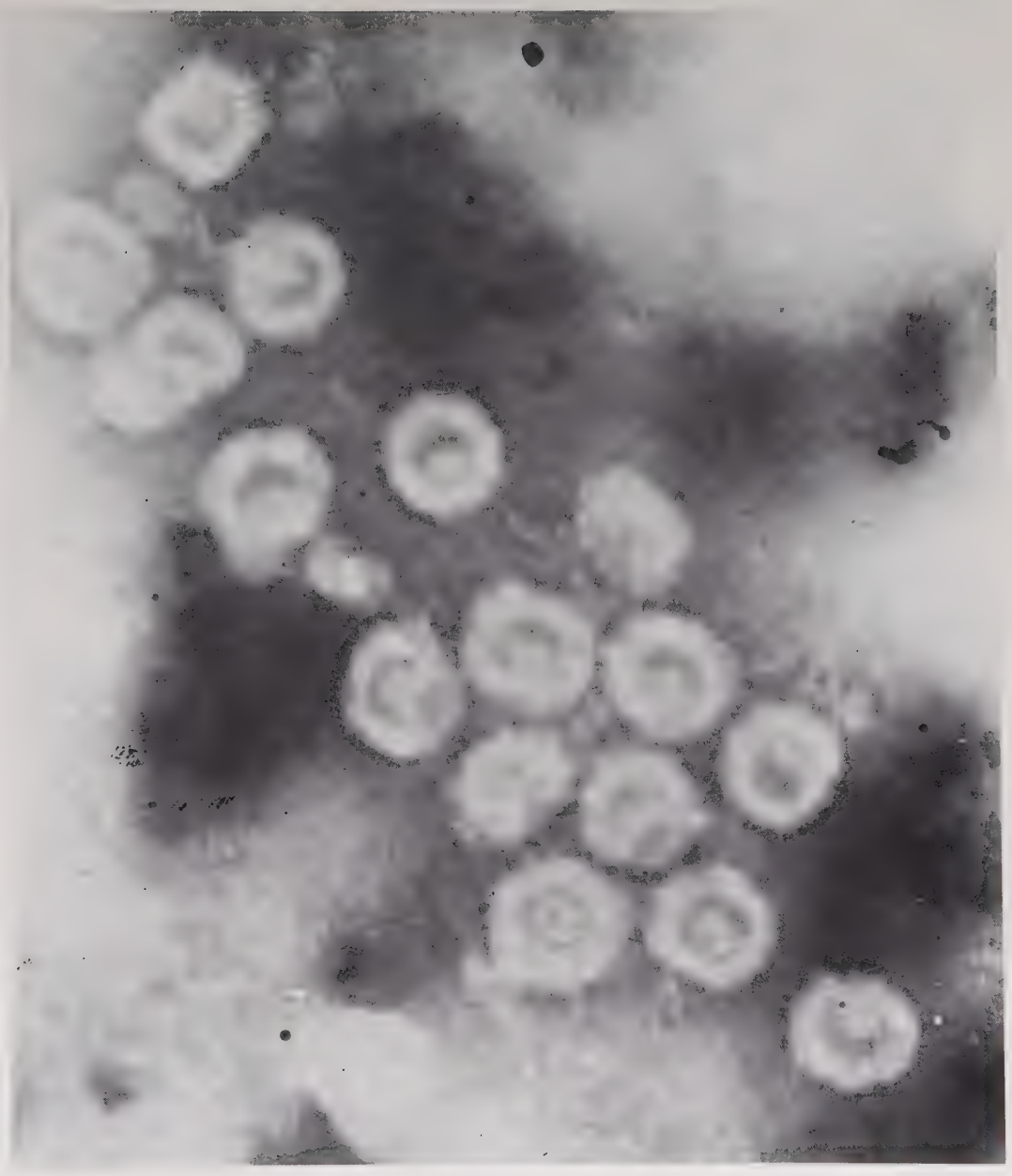


Planche 3 M. RAM. L.A.M. sérum du 23/12/70 (n° 46)
coloration au molybdate d'ammonium à 2 %
grossissement : 450.000

16 particules en cocarde liées entre elles par un "feutrage" masquant les structures fines ; l'aspect d'épingles piquées dans les particules et assurant des jonctions entre elles est assez caractéristique. Il s'agit selon toute vraissemblance de molécules d'immunoglobulines. (peut-être des IgG).

Le sérum présente un pouvoir anticomplémentaire et on peut penser que cet agrégat représente un complexe immun.

Le croisement des différents sérums avec un Ac anti Au permet de révéler que l'Ag Au est une entité immunologique qui se présente sous 3 morphologies différentes. Un lien structural doit relier ces 3 types de particules.

3°/ **Ordre dynamique :**

- Il est intéressant de constater que les particules en cocarde sont retrouvées dans la circulation sanguine, deux mois environ avant le "clocher" des transaminases.

- A l'augmentation du titre en Ag Au au clocher des transaminases et bilirubine correspond la libération massive d'Ag Au. Il semble logique de penser que les formes rondes et en bâtonnet sont brutalement libérées dans la circulation sanguine par l'hépatolyse.

- L'agrégation des particules dans la phase pré-ictérique puis leur dispersion sembleraient montrer qu'il y a eu, au début, une synthèse d'Ac responsable de cette agrégation (les complexes formés Ag-Ac ayant fixé le complément entrainent l'apparition d'un pouvoir anticomplémentaire du sérum).

  Cette synthèse d'Ac s'est maintenue, a diminué ou a été bloquée par l'inondation massive de l'Ag Au chez ce malade immunodéprimé dans la circulation sanguine. Il semble que l'on puisse invoquer un phénomène de paralysie immunitaire par inondation, hypothèse dont les preuves restent à apporter.

- Cette observation est particulière par son contexte de leucémie aiguë myéloblastique. Le malade était traité par des substances cytostatiques douées de propriétés immunosuppressives. Cela la rend difficilement généralisable quant aux aspects que peut présenter une hépatite à Ag Au chez un sujet n'ayant pas d'autre pathologie associée à l'hépatite.

  Il reste à déterminer le rôle de "l'état d'immunité" de l'organisme dans la dynamique de la libération de l'Ag Au dans le sang et dans l'apparition et la morphologie des différents types de particules

LEUCEMIES

I - 1er CAS

a) Evolution de la maladie

M. MON, 41 ans, est sans antécédents particuliers quand le diagnostic de leucémie lymphoïde chronique est posé en mars 1970.

Il est traité au Cortancyl, puis une polychimiothérapie est entreprise à partir du 15 septembre.

En octobre 1970, apparaît un ictère qui régresse lentement. La maladie évolue en un syndrome de Richter et le 8 Juillet 1971, un nouvel ictère apparaît qui croit en intensité progressivement du 30 août jusqu'à sa mort le 4 octobre 1971.

La mention de transfusions reçues au cours de sa maladie n'a pas été retrouvée.

b) Examens biologiques et immunologiques

- Les résultats sont rapportés dans le tableau nº 4. Il permettent de voir que le malade a fait un premier ictère rétentionnel d'octobre à décembre 1970 puis en avril une hépatite avec subictère, transaminases élevées et phosphatases alcalines normales.

Un troisième ictère apparaissait en juillet 1970 avec très forte augmentation des phosphatases alcalines et bilirubine à 280 mg.

La recherche d'Ag Au est négative le 3 février 1971.

Le 17 mars une nouvelle recherche est positive avec un titre du 1/320 en E.I.D. Ce titre augmentait au 1/640 le 20 avril puis diminuait progressivement et l'Ag disparaissait début octobre.

c) Résultats de la microscopie électronique

Tableau nº 5.

Il permet de voir que l'Ag Au est présent sous les trois morphologies déjà rencontrées : cocardes, particules rondes et bâtonnets qui sont particulièrement longs. Les particules sont réparties sur les grilles d'une manière homogène.

- 1 - La mention de transfusions de sang n'étant pas retrouvée, la porte d'entrée du "virus" la plus probable semble être parentérale (nombreuses injections médicamenteuses).

- 2 - L'augmentation de titre brutale en Ag Au correspondant à un "clocher" des transaminases permet de relier la libération de l'Ag Au dans le sang avec l'hépatolyse observée au mois de juillet.

- 3 - Le pourcentage des particules en cocarde est toujours resté très important.

- 4 - Les différentes particules d'Ag Au sont toujours restées dispersées.

- 5 - On peut suivre en fonction du temps l'altération progressive des structures particulaires; les cocardes sont les plus résistantes à la désagrégation.

II - 2ème CAS

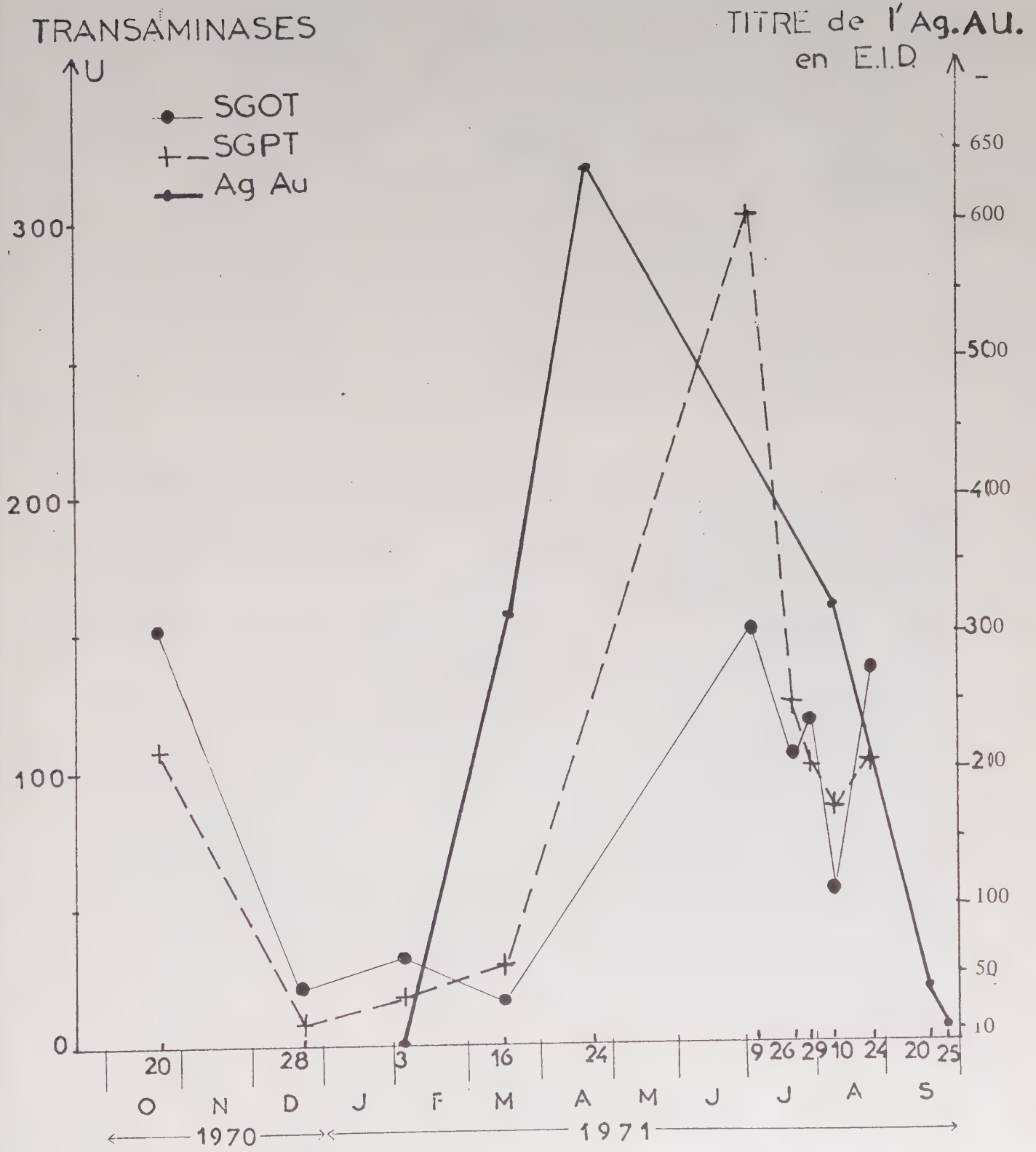
a) Evolution de la maladie

Mme PHI, 24 ans. (Tableau 6)

Le diagnostic de leucémie aiguë myéloblastique est posé en septembre 69 et la malade est traitée par une polychimiothérapie qui aboutit à une rémission.

En janvier 1970, on observe une rechute de l'anémie. La malade reçoit alors une transfusion par semaine jusqu'en mai 1970.

TABLEAU 4



Légende : M. MON L.L.C. - Hépatite avec AgAu (transaminases : unités Frankel).

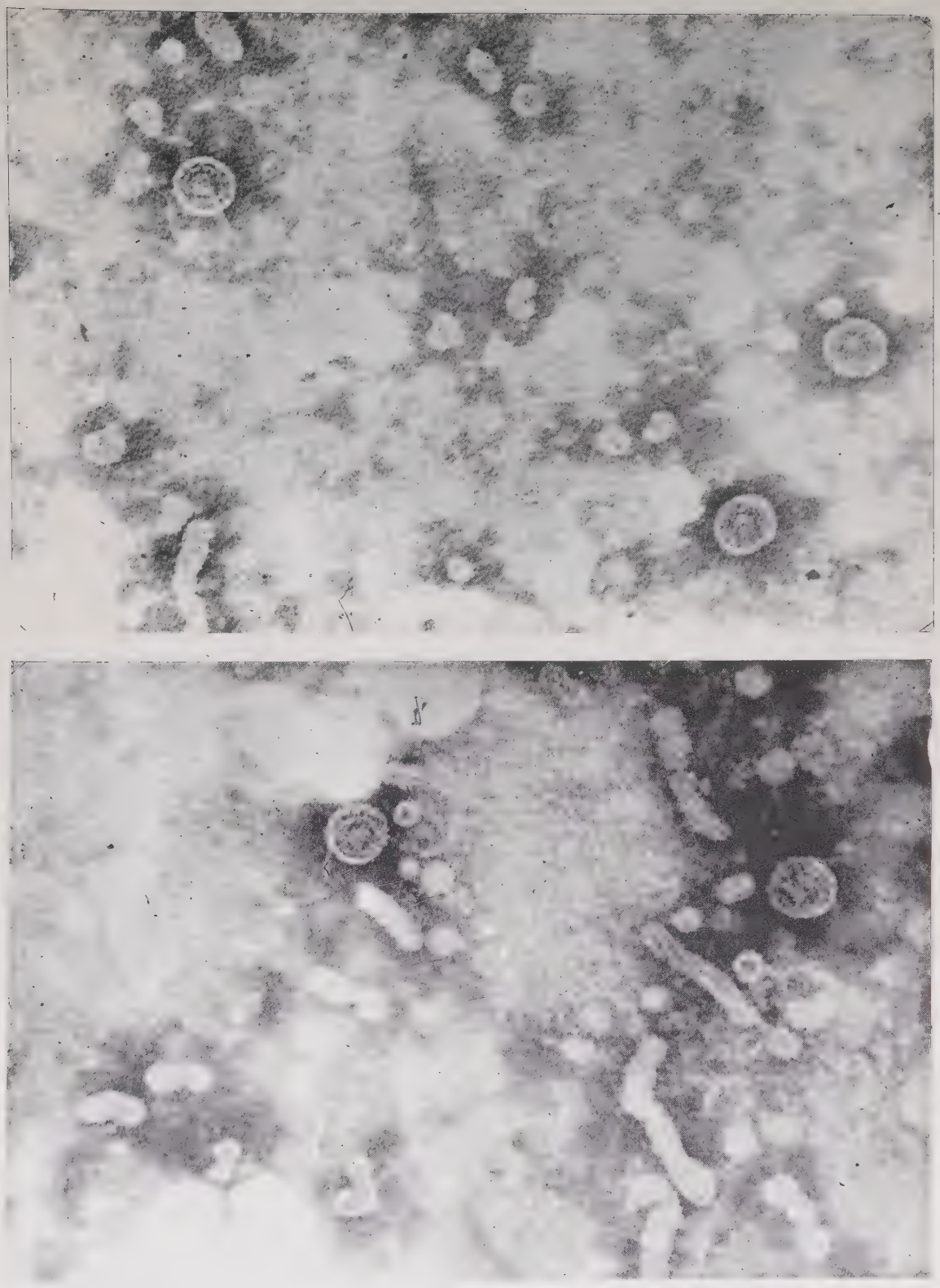
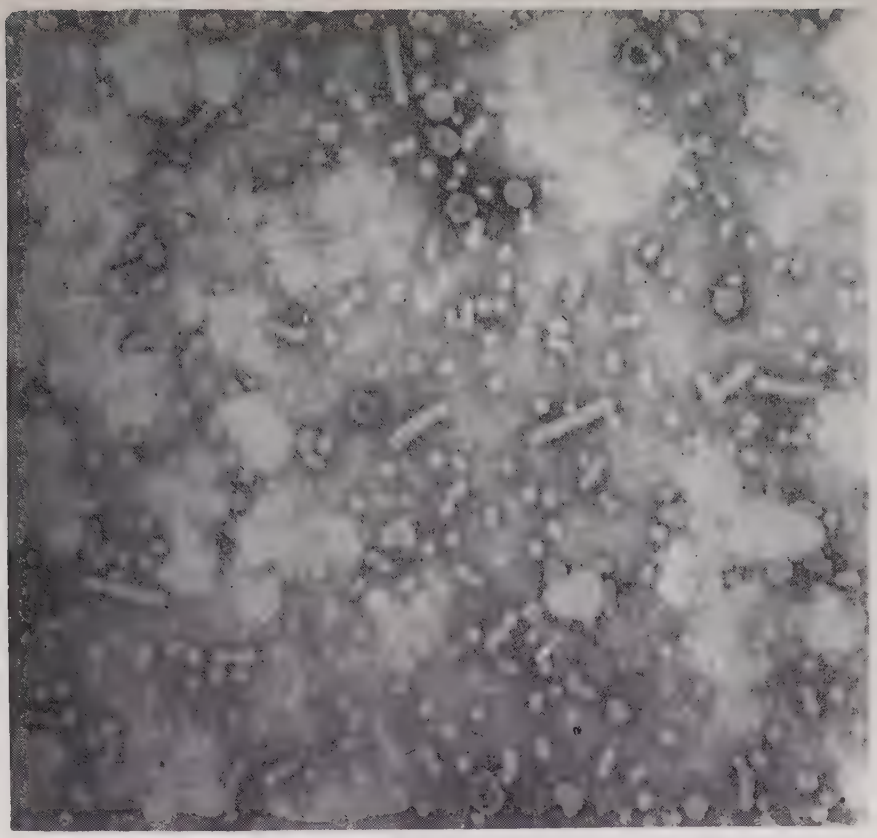


Planche 4 M. Mon. Leucémie lymphoïde chronique. sérum du 17/3/71
traité par oncovin et caryolysine
absence d'ictère et de transaminases élevées

Coloration négative au phosphotunxtate de sodium à 3 %
Grossissement : 240.000

Les trois types particulaires sont représentés ; la structure en double couronne d'aspect granulaire est bien visible pour les cocardes.



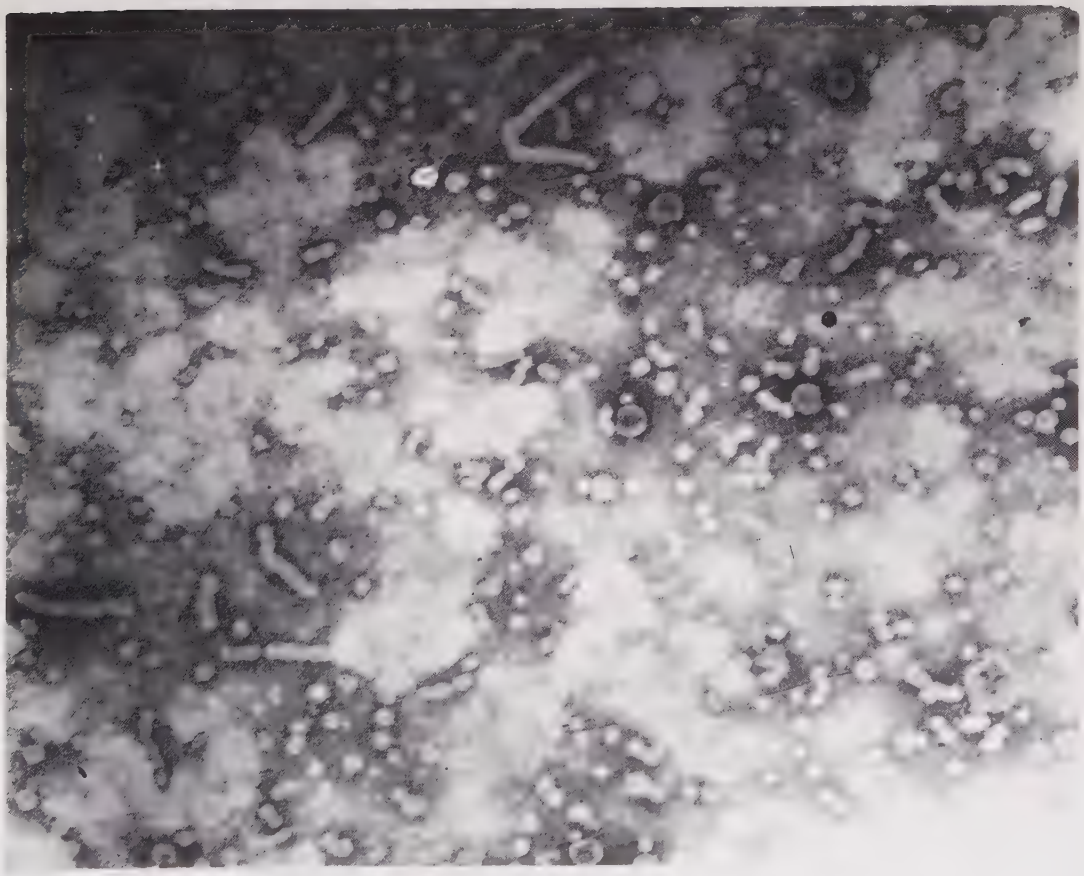


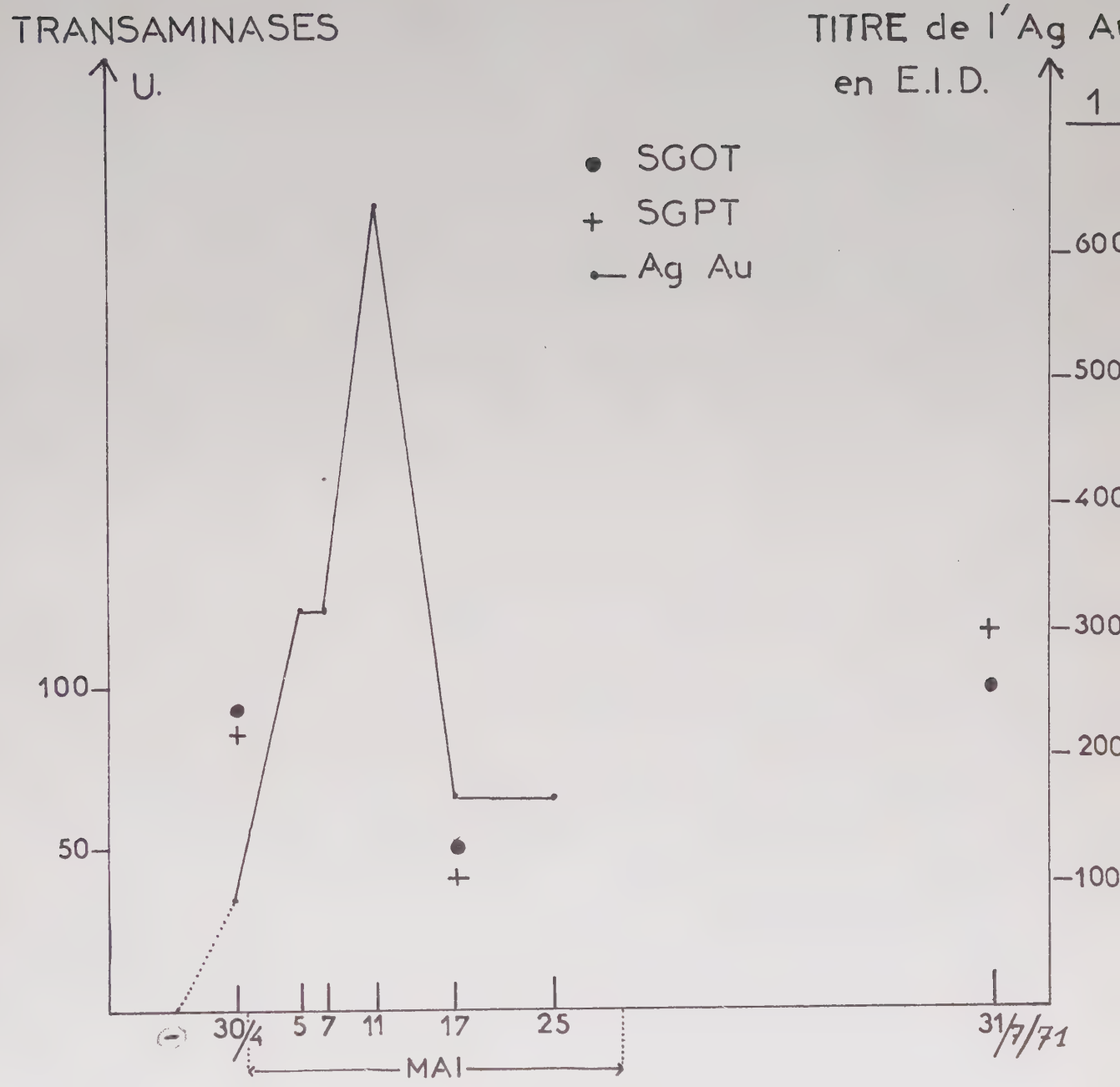
Planche 5 M. MON. L.L.C. serum du 21/4/71
traité par oncovin, caryolysine et cortancyl
absence d'ictère.

Coloration négative au P.T.A. à 3 %
Grossissement : 96.000

Grande richesse particulaire, régulièrement réparties et à structure bien individualisée rondes, en batonnets ou en chapelets de longueur variable mais de diamètre assez constant. Quelques cocardes ont la couronne externe qui s'est ouverte

TABLEAU 5 M. MON. L.L.C.

Traitement	Ictère au moment du prélèvement	- Date des prélèvements - Traitement en cours	Répartition des particules d'Ag Au sur les grilles	Types de particules présentes	Nombre de particules en cocarde par champ micr.	Pourcentage des cocardes aux autres morphologies de l'Ag Au	Titre de l'Ag Au en E.I.D.
1 Oncovin 2 Caryolysine	- absence d'ictère et de transaminases élevées	- 17.3.71 1 + 2	Dispersées	- rondes - tubulaires - cocardes	5 à 15	4 %	1/320
3 Natulan 4 Cortancyl	absence d'ictère	- 21.4.71 1 + 2 + 4	Dispersées	id	2 à 4	10 %	1/640
	ictère rétentionnel	- 20.9.71 1 + 2 + 3 + 4	Dispersées	- ronde - tubulaires très altérées de couleur blanche - cocardes à structure empatée	0,2	5 %	1/40
	ictère rétentionnel	- 25.9.71 1 + 2 + 3 + 4	Dispersées	- rondes - tubulaires en voie de désagrégation	0,1	10 %	1/10



Légende : Tableau 6 - M. PHI - L.A.M.

TABLEAU 7

Traitement	Ictère au moment des prélèvements	- Date des prélèvements - Traitements en cours	Répartition des particules d'Ag Au sur les grilles	Type de particules présents	Nombre de part. en cocarde/par champ micros.	Pourcentage des cocardes/ aux autres morphologies de l'Ag Au	Titre de l'Ag Au
1 Oncovin 2 Cytosine	30.4.71 Ictère transaminases élevées.	30.4.71 4	Dispersées	- cocardes - billes absence de bâtonnets	1	2 %	1/80
3 Arabinoside 4 Corticoïdes	17.5.71 absence d'ictère transaminases normales	17.5.71 5 + 6	Dispersées	- cocardes - billes - bâtonnets très rares	5 à 20	0,1 %	1/320
5 Purinethol 6 Méthotrexate	25.5.71 absence d'ictère transaminases normales	25.5.71 5 + 6	Dispersées	- cocardes - billes - bâtonnets	5 à 15	1 %	1/160

Le 12 juin 1970, apparaît un ictère intense avec vomissements (transaminases : SGPT : 200 UF - SGOT : 210 UF) et un traitement par les corticoïdes est entrepris.

La chimiothérapie est maintenue et la rémission se poursuit jusqu'en avril 71 où un nouvel ictère apparaît (SGOT : 94 ; SGPT : 98). La polychimiothérapie est interrompue ; les corticoïdes sont maintenus.

En juin 1971, la malade est remise aux cytostatiques et elle devait sortir de l'hôpital en juillet avec un état général meilleur.

b) **Résultats des examens immunologiques et M.E.** (tableau nº 7)

L'Ag Au est découvert pour la première fois le 30 avril 1971 avec un titre de 1/80 en E.I.D. Ce dernier devait passer successivement par un maximum le 11 Mai avec 1/640 et redescendre au 1/160 les 17 et 25 Mai, dernier examen effectué.

La morphologie de l'Ag est caractérisée par la grande richesse en petites particules et l'absence presque complète de bâtonnets. Les particules sont dispersées ; le nombre de cocardes est élevé : 2 % et on observe une baisse relative des cocardes par rapport aux autres formes de particules (0,1 %), correspondant avec la montée du titre en Ag Au.

Cette observation très fragmentaire et incomplète permet de voir que la malade a fait une première hépatite virale post transfusionnelle en juin 1970 ; nous ne savons pas si l'Ag Au était présent à ce moment là.

Un nouvel ictère en avril 71 avec transaminases élevées et Ag Au permet d'incriminer directement ce dernier dans ce processus à cause de sa variation de titre. Sa libération au moment du deuxième ictère semble correspondre à une lyse cellulaire accrue momentanée.

Le monomorphisme et le nombre des petites particules sont remarquables et cela est à rapprocher de l'observation précédente (Mr RAM).

III - 3ème CAS

Mme CAL, 41 ans

a) **Evolution de la maladie**

Le diagnostic de leucémie aiguë myéloblastique est posé en septembre 1970, date à laquelle une polychimiothérapie est commencée. Le traitement entraîne une rémission à partir de décembre 1970.

- Réhospitalisée en février 1971, son bon état clinique est constaté excepté une splénomégalie importante. La chimiothérapie est poursuivie jusqu'en juin 1971.

Aucun ictère, ni d'augmentation de transaminases n'ont été observés.

Deux recherches d'Ag Au ont pu être effectuées le 4 mars 1971, en E.I.D. (+ → 1/2) et le 25 juin 1971, (+ → 1/10)

La microscopie électronique effectuée sur le prélèvement du 25 juin (traitement en cours : rubidomycine, méthotrexate et purinethol) a montré que les trois types de particules étaient présents, à l'état dispersé à raison de 2% pour les formes en cocardes d'aspect souvent "plein".

Les bâtonnets présentent une structure tubulaire et sont très longs.

Cette malade n'ayant jamais eu d'ictère ni de transaminases élevées, et avec un titre faible en Ag Au, est considérée comme "porteur d'Ag". Tous les tests hépatiques ont toujours été normaux. On remarque le nombre élevé de cocardes.

M. WAR

Leucémie sous polychimiothérapie ; la notion d'ictère ou d'hépatite n'a pas été retrouvée.

En janvier 1971, nous avons eu un prélèvement de sang et l'Ag Au a été titré en E.I.D. au 1/160. La microscopie électronique a montré les trois formes de particules à l'état dispersé à raison de 5 à 10 cocardes par champ et 5 % par rapport aux autres formes.

En conclusion, M. WAR est un porteur d'Ag Au avec un pourcentage de cocardes important et un titre en Ag Au élevé.

HEMODIALYSES RENAUX

1° Histoire clinique

M. VAS, est dialysé depuis le mois d'octobre 1968 à raison de 2 séances par semaine

Il a reçu 5 transfusions au cours de la période allant d'Octobre 1968 à Octobre 1970, la dernière remontant à Juillet 1970.

La recherche de l'Ag Au est positive en Octobre 1969 ; le bilan hépatique est normal à cette date mais on retrouve en Avril 1969 un épisode de transaminases augmentées transitoirement (140 unités). **Sa femme contractait une hépatite ictérique en Septembre 1969.**

L'Ag Au a persisté jusqu'en Septembre 1970, date du prélèvement que nous avons étudié.

M. PHA, est dialysé 3 fois par semaine depuis le 24 Décembre 1968.

La première recherche de l'Ag Au, le 27 Novembre 1969, fut positive avec un bilan hépatique normal : SGPT : 5 UF . Le nombre d'unités de sang a été supérieur à 20 dont 5 dans les 4 derniers mois. Aucun antécédent d'hépatite, **mais sa femme a eu un ictère en Novembre 1969** au moment de la découverte de l'Ag Au chez M. PHA.

2° Résultats des examens immunologiques et en microscopie électronique

Ils sont rapportés dans le tableau n° 8 et permettent de voir que pour les 2 cas :

1 - la quantité d'Ag circulant est très élevée.

2 - les 3 types de particules d'Ag Au sont présents à l'état dispersé avec un pourcentage de "cocardes" notable.

3 - les formes variées présentées par les particules d'Ag, en particulier l'aspect des bâtonnets, avec des étranglements et renflements successifs, et un contour peu net,donnent l'aspect de particules en voie de dégradation.

4 - la coloration au molybdate a permis de montrer la structure centrée des petites particules et l'aspect en chaîne de ces mêmes particules constituant les bâtonnets. (Planche 6)

Conclusions

1° L'aspect des particules est assez particulier et seules les cocardes gardent une morphologie semblable avec des variations de dimension allant de 380 à 420 Å ; leur pourcentage est élevé.

2° L'altération de la morphologie de l'Ag Au est à rapprocher avec le fait que l'Ag Au examiné était circulant depuis 1 an dans le sang. Sa persistance chez les dialysés a été étudiée par différents auteurs. (137).

3° Sur les 2 sujets, l'un a eu un épisode de transaminases élevées très fugitif 6 mois avant la découverte de l'Ag Au et l'autre n'a jamais eu d'ictère, ni de transaminases élevées

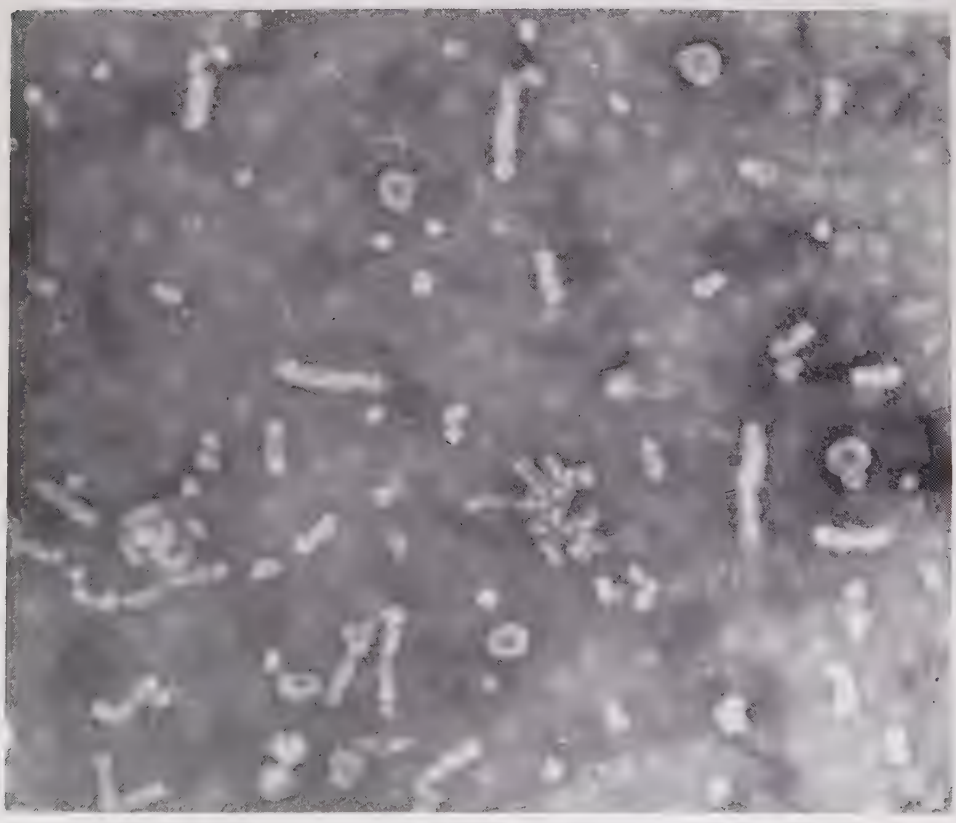
Ces 2 sujets, le 8 Octobre 1970, peuvent donc être considérés comme "**porteurs d'Ag**"

4° Les femmes de ces 2 malades ont fait une hépatite au moment de la découverte de l'Ag Au dans le sang. Cette constatation plaide en faveur de la contagiosité de ces malades qui présentent un grand nombre de cocardes circulantes dans leur sang.

TABLEAU 8

NOM	DATE DES PRELEVEMENTS TRAITEMENT	REPARTITION DES PARTICULES D'Ag AU SUR LES GRILLES	TYPES DE PARTICULES PRESENTES	NOMBRE DE PARTICULES EN COCARDE PAR CHAMP MICROSCOPIQUE	POURCENTAGE DE COCARDES PAR RAPPORT AUX AUTRES MORPHOLOGIES DE L'Ag Au	TITRE DE L'Ag Au en		
						I. D.	E. I. D.	F. C.
PHA	8 - 10 - 1970 néant	Dispersées	- rondes de 110 à 260 A - bâtonnets : 50 % à structure altérée - cocardes de 380 à 420 A	20 à 40	8 %	1/64	1/320	1/256
VAS	8 - 10 - 1971 néant	Dispersées	- rondes de 150 à 250 A - bâtonnets : 50 % présentant un grand plémorphisme - cocardes de 380 à 420 A	20 à 30	5 %	1/32	1/160	1/256

a



Plan : 6 Hémodialysés (a) M. PHA - (b) M. VAS
Coloration au molybdate d'ammonium à 2 % (a)
au phosphotunxtate de sodium à 3 % (b)
grossissement : (a) 120.000 - (b) : 140.000

Les trois types de particules sont présentes à l'état dispersé, avec une morphologie assez altérée pour les bâtonnets et les formes rondes. Le molybdate permet de souligner la structure centrée des particules rondes et l'aspect en chainette des bâtonnets.
L'Ag Au est présent dans le sang depuis un an.

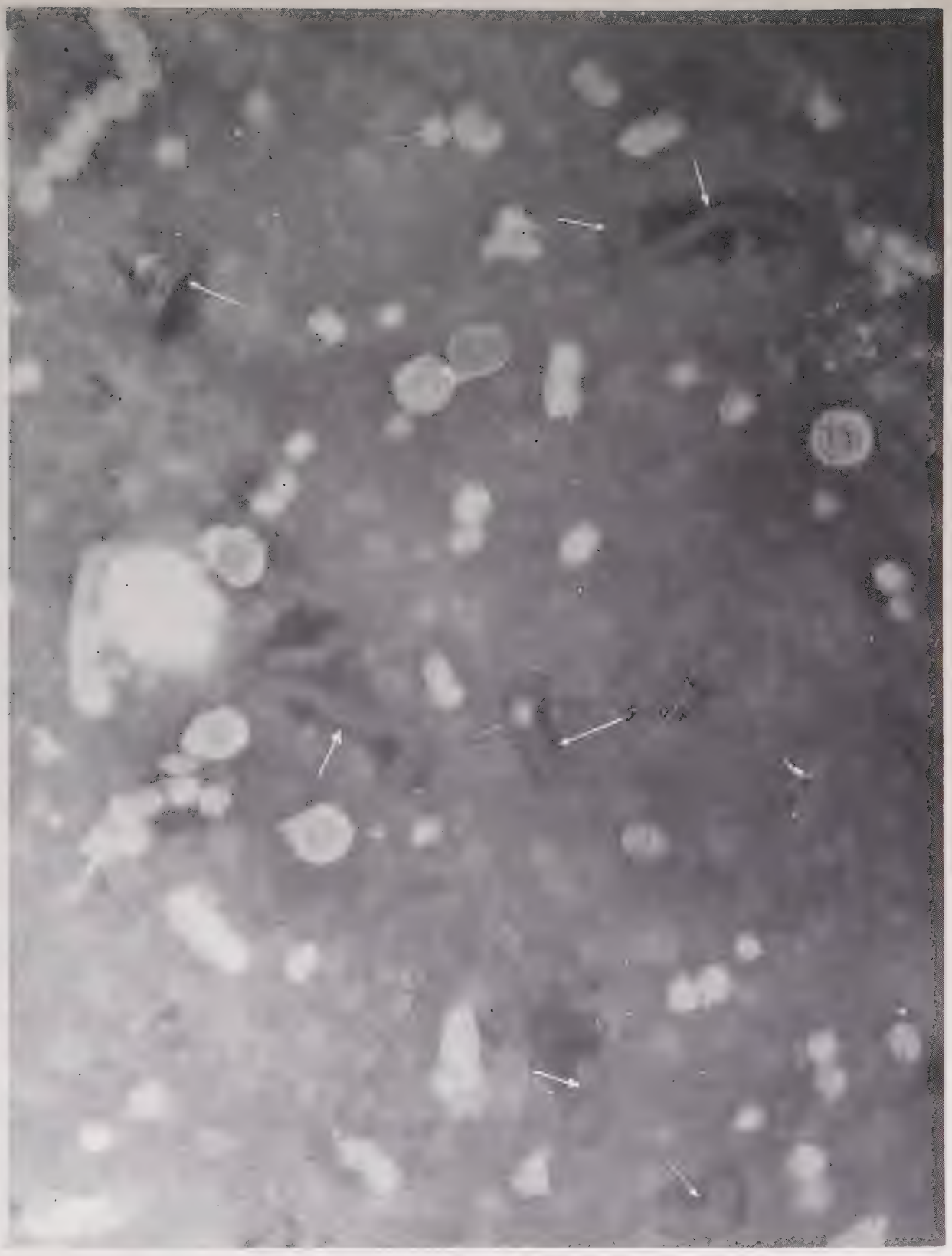


Planche 7 Hémodialysé
Coloration négative au P.T.A. à 3 %
Grossissement : x 240.000

Sérum présentant des images de particules d'Ag Au tout à fait caractéristiques par la double population que l'on peut remarquer sur cette photographie.
1) des bâtonnets et des particules rondes d'aspect difforme, boursoufflées, à contour et structure floue ; certaines cocardes ont une gangue qui vient empâter la partie externe.
2) des bâtonnets à contour plus régulier (⟶) avec un centre plus clair, dont la structure est visible, avec une "coloration" plus grise.
L'Ag Au est libéré dans le sang depuis plus d'un an et les particules difformes et floues correspondent à des particules anciennes qui sont en voie de dégradation ; la coloration blanche traduit une composition chimique particulière vraisemblablement des lipoprotéines et phospholipides qui sont venus se surajouter à la structure initiale des particules.
Les bâtonnets à structure plus grise, et structurés représentent des particules neuves qui viennent d'être libérées dans le sang.

TRANSPLANTES RENAUX

Nous avons étudié le sérum de 4 malades traités aux immunosuppresseurs (azathioprine : 2 mg/kg/jour) pour empêcher le rejet des greffes.

1° Histoire clinique

M. BOR, n'a jamais eu d'ictère. D'Avril 1968 à Juillet 1969, il a subit 2 séances de "dialyse rénale" par semaine et a reçu 15 unités de sang. Il est transplanté en Juillet 1969.

L'Ag Au est retrouvé en Septembre 1969 ; le bilan hépatique est alors normal. Un mois auparavant, on notait une augmentation des transaminases à 57 UF. L'Ag Au était retrouvé jusqu'en Décembre 1970, dernier prélèvement étudié. Au cours de cette période, le bilan hépatique était perturbé.

M. REM, n'a pas eu d'ictère antérieurement. Il a subit 2 séances d'hémodialyse par semaine depuis Décembre 1967 et a reçu 12 transfusions jusqu'en Août 1968 date à laquelle il fut transplanté.

L'Ag Au est trouvé positif en Septembre 1969. 10 jours auparavant, les transaminases étaient à 62 UF. Elles s'élevaient à 83 UF et s'abaissaient quelques temps après à la normale. Les prélèvements effectués en Novembre 1969, Janvier, Février 1970 et les mois suivants montraient la persistance de l'Ag Au. Le prélèvement étudié est celui de Décembre 1970.

M. LER, comme les 2 cas précédents, n'a pas eu antérieurement d'ictère ou d'hépatite. Ce malade a subit 68 séances de "dialyse rénale" et a reçu 10 unités de sang. Il est transplanté en Novembre 1969.

L'Ag Au est détecté en Mars 1970. Il faut remarquer qu'il n'a reçu aucune transfusion entre le mois de Novembre 1969 (date à laquelle la première recherche en Ag Au était négative) et Mars 1970 où la recherche est positive. A aucun moment il n'y a eu de perturbation du bilan hépatique.

M. LIE, a subit 7 séances d'hémodialyse et a reçu 18 unités de sang. En Juin 1968, il est transplanté.

Le bilan hépatique effectué régulièrement montre une augmentation des transaminases en Novembre 1968 à 68 UF puis les jours suivants à 160 UF. Il devait rester perturbé jusqu'en Février 1969. Par la suite, les contrôles hépatiques ont été strictement normaux.

L'Ag Au était retrouvé en Septembre 1969 et dans tous les prélèvements ultérieurs.

Il faut remarquer que sa femme a eu une hépatite en Mai 1969.

2° Résultats des examens immunologiques et en microscopie électronique

Tableau n° 9

Les 4 sérums ont un aspect sensiblement identique :

un titre élevé en Ag Au dont toutes les particules sont à l'état dispersé, sous les 3 morphologies : rondes, tubulaires, en cocarde et avec une quatrième forme, en raquette, d'aspect intermédiaire entre le bâtonnet et la cocarde.

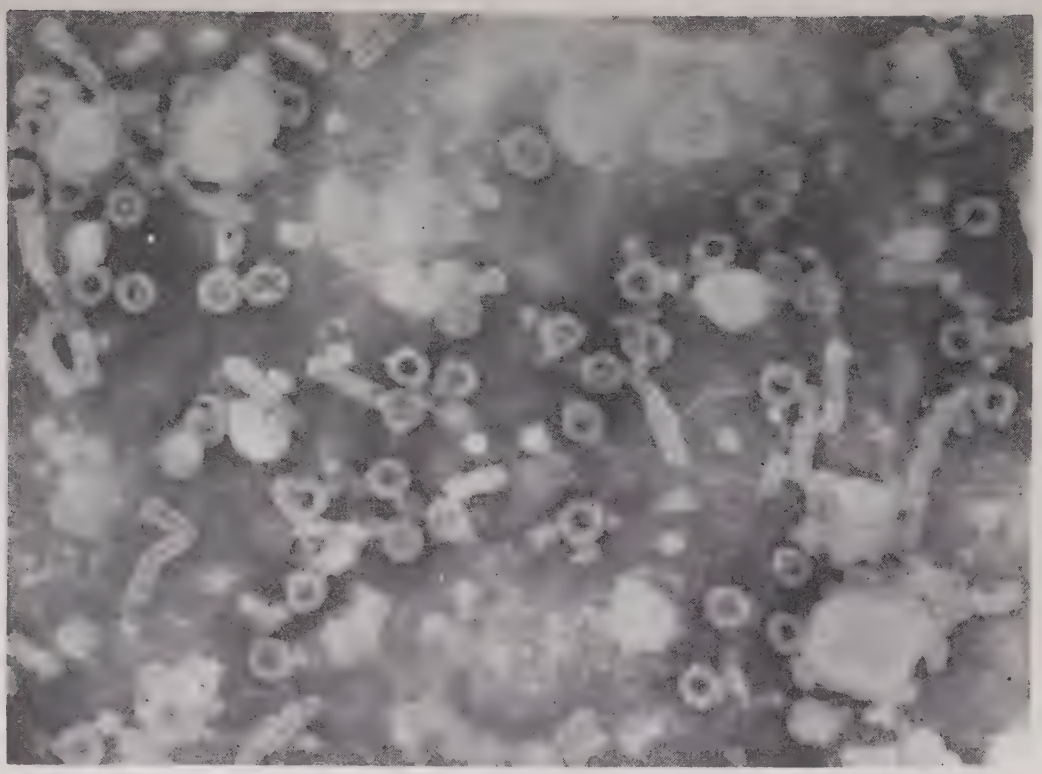
Les 4 sujets, au moment des prélèvements, n'ont aucune perturbation des constantes biologiques hépatiques et sont considérés comme porteurs chroniques d'Ag Au.

TABLEAU 9

NOM	DATES		Traitement	Transaminases au moment du prélèvement	Répartition des particules d'Ag Au sur les grilles	Types de particules présentes	Nombre de cocardes par champ microscopique	Pourcentage des cocardes /aux autres particules	Titre en Ag Au		
	du Prélèvement étudié	de la Découverte de l'Ag Au							I.D.	E.I.D.	F.C.
BOR	6-7-70	23-9-69	Immuran 2mg /kg jour	normales	Dispersées	- rondes - tubulaires - cocardes	10 à 30	50 %	1/16	+ 1/320	+ + 1/256
REM	4-12-70	25-9-69	Immuran 2mg /kg/jour	normales	id	id	30 à 40	5 %	1/64	+ 1/320	+ + + + 1/256
LER	17-12-70	21-3-70	id	id	id	id	10 à 30	10 %	1/16	+ 1/160	+ + 1/256
LIE	1-9-70	5-9-69	id	id	id	id	100 à 150	60 %	1/128	+ 1/1280	+ + + + 1/512

Transplantés rénaux.

a



b

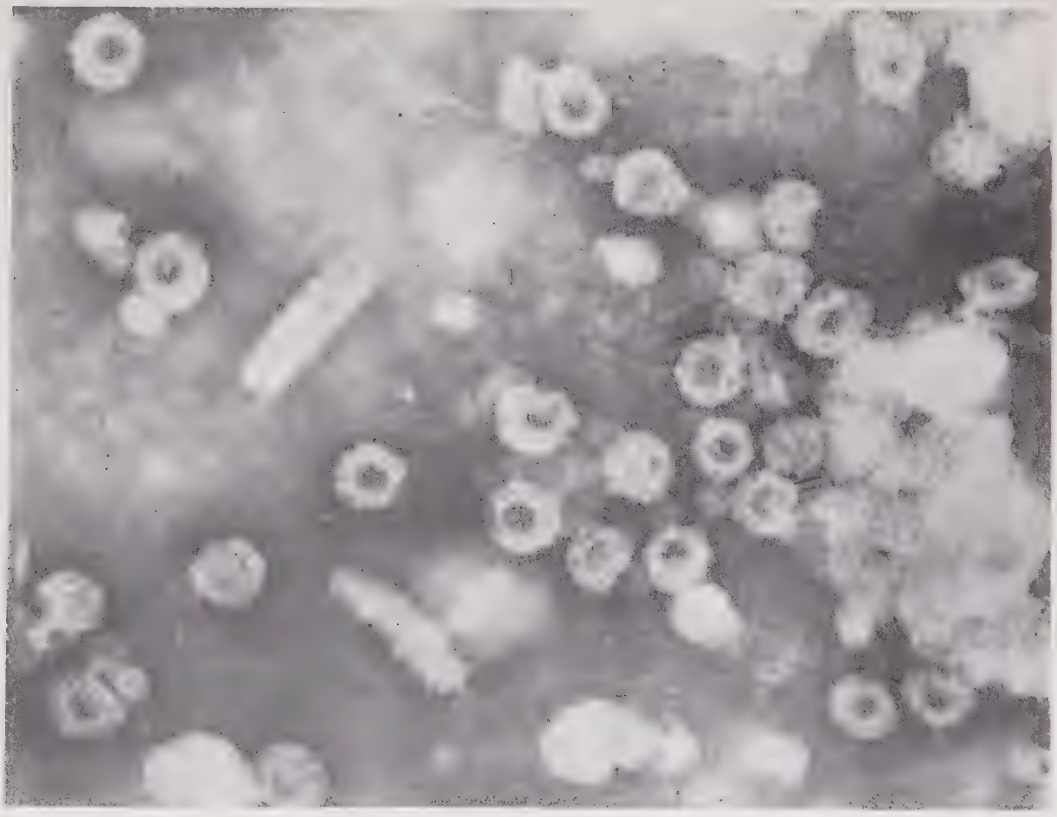


Planche 8 Transplantés rénaux M. LIE (a) M. BOR (b)
Coloration au P.T.A. à 3 % traités par l'imuran.
Grossissement : (a) x 144.000 - (b) x 240.000

Majorité de formes en cocarde pleines ou vides avec une double couronne visible. On remarque la dimension régulière de toutes les particules en cocarde alors que les bâtonnets ont des formes et des structures variés.

CONCLUSION GENERALE

Ces 6 sujets présentent en commun les faits suivants :

– Une augmentation des transaminases très fugace ou même nulle, l'absence d'ictère et un Ag Au persistant à un titre élevé, avec un pourcentage important des formes en cocarde.

Une relation entre la persistance de l'Ag Au et l'absence d'ictère avec un déficit immunitaire a déjà été faite (137 - 97) chez les dialysés et les transplantés rénaux.

– Il existe en effet chez les dialysés une immunosuppression provoquée par l'urémie chronique (137). Dammin a démontré expérimentalement que les homogreffes de peau avaient une survie prolongée chez les urémiques.

WILSON et KIRPATRICK ont constaté chez les mêmes malades :
- une diminution du nombre des lymphocytes,
- une atrophie du thymus,
- une diminution des réponses cellulaires à des antigènes variés, viraux, bactériens... etc.

– Chez les transplantés, l'immunosuppression est entretenue par le traitement (Azathioprine) à forte dose dans les suites immédiates de la transplantation, ensuite plus modérée.

Nous faisons donc le rapprochement entre le déficit immunitaire de ces sujets, le pourcentage élevé des formes en cocarde de l'Ag Au et leur contagiosité pour l'entourage.

COLLAGENOSES

1 - PERIARTERITE NOUEUSE (P.A.N.)

1°/ Histoire clinique

Mme POI, 39 ans, est hospitalisée dans le service du Professeur Sarrazin en mai 1970 pour un **syndrome polyarticulaire**, fébrile, une **atteinte rénale** et une hypertension artérielle évoquant une périartérite noueuse. Les premiers examens biologiques mettent en évidence un syndrome inflammatoire (V.S. accélérée et fibrinogène augmenté) et une atteinte biologique hépatique (SGOT : 130, SGPT : 180 - épreuve à la BSP montrant une rétention importante : 40 % au bout de 45 minutes - et gamma-globulines : 39 %)

La biopsie hépatique révèle une discrète fibrose avec quelques infiltrats inflammatoires dans les espaces portes et le diagnostic **d'hépatite chronique** est établi.

Elle ne présente pas d'antécédents d'hépatite ni d'inoculation, mais une **notion de contage** est trouvée (une collègue de bureau de son mari faisait une hépatite début mai 1970 date à laquelle les premières manifestations pathologiques apparaissaient chez la malade).

Une **corticothérapie** est entreprise début juin, mais interrompue au bout de 4 jours à la suite de crises comitiales généralisées. La biopsie deltoïdienne montre une histologie qui permet de porter le diagnostic de **périartérite noueuse.**

La recherche de l'Ag Au effectuée les 4 et 17 juin 1970 est positive.

En novembre 1970, une thérapeutique immunosuppressive (chloraminophène) est commencée. L'Ag Au se maintient dans le sang de cette malade jusqu'en octobre 1971, dernier examen effectué.

. / Résultats des examens immunologiques et en microscopie électronique

Tableau n° 10

- Les deux prélèvements étudiés - du 6 octobre 1970 et du 4 mai 1971 - permettent de voir la persistance de l'Ag Au à un titre constant.
- Les trois morphologies sont présentes ; le nombre des cocardes est plus élevé en octobre 1971. La malade est alors depuis onze mois sous chloraminophène.
- 30 % de l'Ag Au est sous forme de microagrégats en octobre 1970. Sept mois plus tard, 5 % seulement de l'Ag Au est sous forme de complexes mais de taille beaucoup plus considérable et comprenant jusqu'à 200 cocardes par agrégat.

Nous sommes en présence d'un cas de P.A.N. répondant aux critères histopathologiques et associés à une hépatite chronique, alors que l'Ag Au a été mis en évidence dès le début de la maladie.

Les conditions de chronologie de l'hépatite et de la P.A.N. sont peu claires et nous savons que l'Ag Au a été trouvé en mai 1970, date à laquelle sont apparues les premières manifestations pathologiques : douleurs articulaires et déficience rénale. L'Ag Au se présente alors sous forme de complexes en excès d'Ag que l'on peut incriminer directement dans ces mécanismes pathologiques.

TABLEAU 10

Date des prélèvements et Traitements	Répartition des particules d'Ag Au sur les grilles	Types des particules présentes	Nombre de particules en cocarde par champ microscopique	Pourcentage des cocardes / aux autres morphologies de l'Ag Au	Titre de l'Ag Au		
					I. D.	E.I.D.	F.C.
6.10.70 4 jours de corticoïdes en juin 70	Dispersées : 70 % Agrégées : 30 % en microagrégats : - de 2 à 10 cocardes - de formes rondes - de formes rondes et tubulaires - de formes rondes, tubulaires, en cocarde	- rondes - tubulaires - en cocarde	10 à 30	50 %	1/64	1/160	+ + 1/512
4.5.71 Depuis novembre 70 chloramino-phène	Dispersées 95 % Agrégées 5 % - en microagrégats et - en volumineux agrégats de 100 à 200 cocardes Toutes les structures sont assez altérées	- rondes - tubulaires - en cocarde	10 à 100	70 %	1/64	1/160	+ + 1/512

Les premières manifestations pathologiques chez le malade ont été les douleurs articulaires.

La liaison entre P.A.N., hépatite et Ag Au a déjà été faite dans plusieurs cas. (89 - 226). On sait que la P.A.N. est considérée comme l'équivalent d'un syndrome d'Arthus généralisé par complexes d'Ag Ac circulant en excès d'Ag et l'histoimmunologie révèle au niveau des lésions vasculaires des immunoglobulines et du complément (77).

La P.A.N. se développerait comme conséquence de ces complexes eux-mêmes qui découlent d'un état immunitaire particulier ?

Les mécanismes qui interviennent sont nombreux et il faut tenir compte du traitement immunosuppresseur chez cette malade qui peut avoir influé sur les changements observés dans l'aspect de l'Ag Au dans le sang en mai 1971. La prudence s'impose dans les conclusions. En effet, il faut savoir que l'on connaît des P.A.N. sans Ag Au.

Il est à priori difficile d'affirmer que l'Ag Au joue un rôle étiologique direct dans la périartérite noueuse. La présence de l'Ag Au dans le sang pourrait n'être que le reflet de l'état immunitaire particulier de ces malades, favorisant l'infestation par le virus de l'hépatite - ou la conséquence du traitement immunosuppresseur.

Cependant différents arguments plaident en faveur de ce rôle pathogène direct : les manifestations articulaires, rénales, les lésions artérielles sont de type pathologie des complexes immuns. L'Ag Au a été retrouvé dans les lésions artérielles. Enfin, notre observation ajoute un argument de poids, par la mise en évidence de l'Ag Au, avant tout traitement immunosuppresseur.

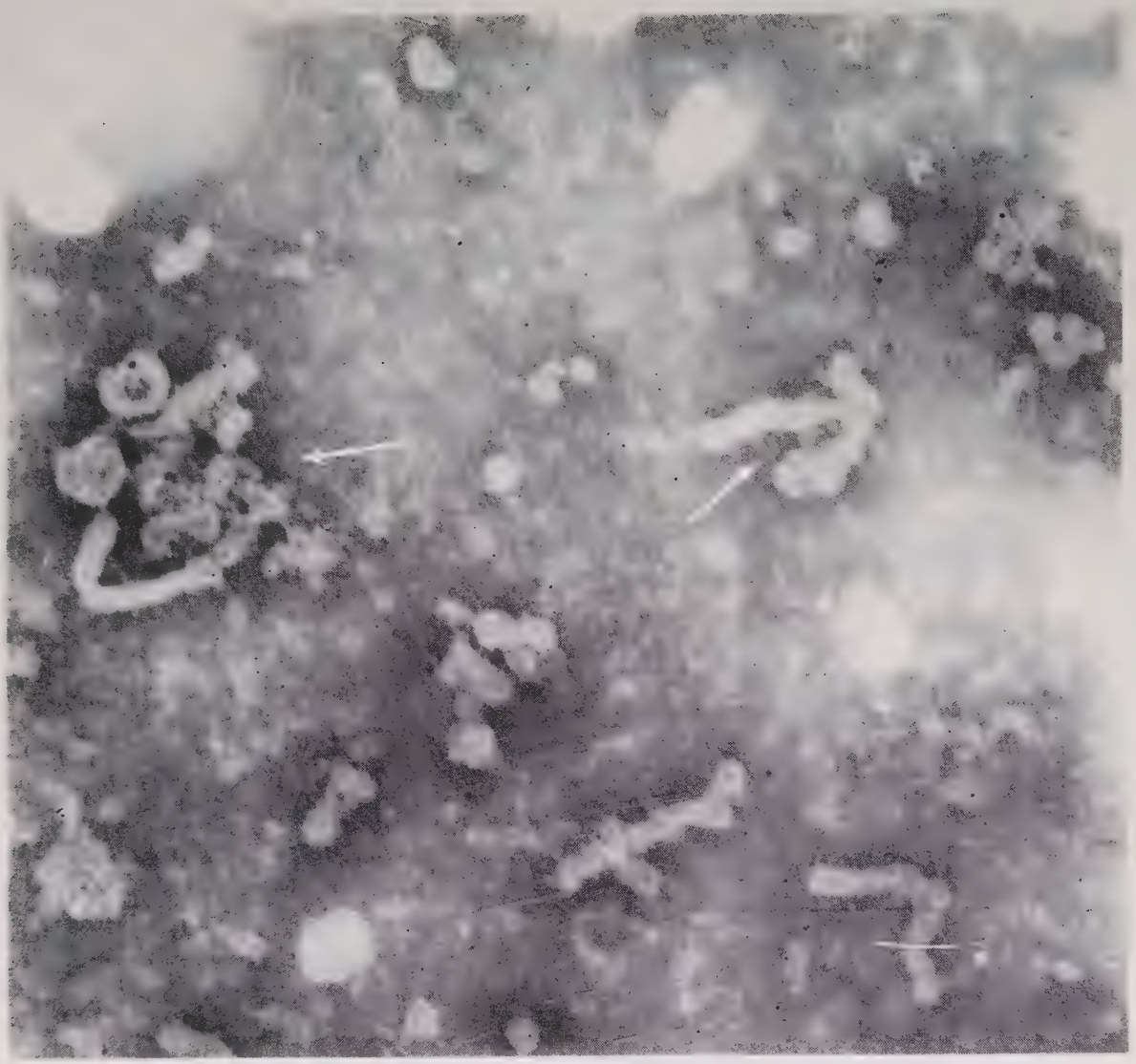


Planche 9 Sérum de M. POI. du 4/5/71 Périartérite noueuse.
Coloration négative au P.T.A. à 3 %
Agrandissement : x 240.000
Particules dispersées d'AgAu et micro-agrégats (—➔)
à contour peu net et structure floue traduisant un empâtement et un remaniement des structures initialement libérées dans le sang.
Cet aspect correspond à un AgAu qui est présent dans le sang depuis un temps assez long.

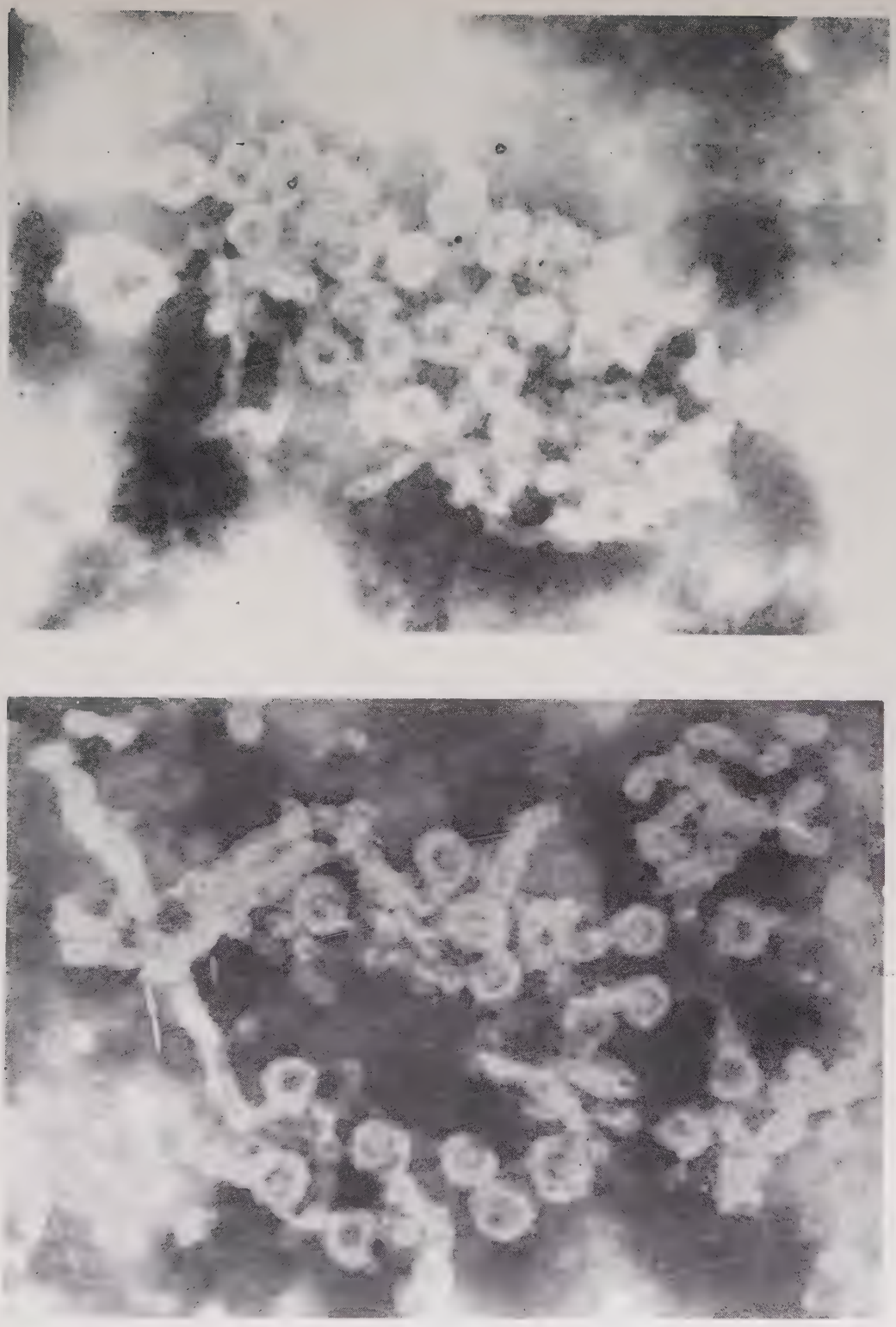


Planche 10 Sérum de M. POI du 4/5/71 P.A.N.
Coloration au P.T.A. à 3 %
Grossissement : 240.000

Agrégats composés en majorité de cocardes représentant des complexes AgAc.
On remarque l'altération des structures.

II - MALADIE DE KAPOSI

1°/ Histoire de la maladie

M. DAH, 28 ANS, malien résidant en France depuis trois ans. En 1968-69, il a présenté des épisodes fébriles.

Il est hospitalisé pour des troubles digestifs (douleurs épigastriques et de la fièvre).

Les premiers examens biologiques effectués révèlent des transaminases et bilirubine normales et un taux de prothrombine à 37 %. Un traitement par déhydroémétine, Rimifon et Etambutol est instauré et la température revient à la normale. La vitesse de sédimentation reste très augmentée (130 à la 1ère heure).

En juillet 1971, il est traité au **Cortancyl** 30 mg/j. Une **biopsie hépatique** révèle une **histologie d'hépatite.**

Par ailleurs, le malade fait une pleurésie et une insuffisance rénale se traduisant par un syndrome néphrotique avec albuminurie importante et une chute des protides sanguins de 75 à 40 g/l.

En septembre 71, hospitalisé dans le service du Professeur GENTILINI, il reçoit des **transfusions**. La présence de **nodules cutanés caractéristiques** et un foie angiomateux permettent de poser le diagnostic de maladie de Kaposi. La biopsie d'un nodule confirme l'histologie d'angiofibrosarcomatose : nombreux vaisseaux, proliférations fibrosarcomateuses, réaction de Perls positive (fer - hémosidérine).

Cette collagénose est traitée par une polychimiothérapie: Caryolysine, Oncovin, Natulan, Chloraminophène.

L'insuffisance rénale s'accentue et l'urée sanguine augmente successivement : 0,15 - 0,50 pour dépasser 4 g. Le malade meurt le 10 novembre dans un coma urémique.

Examens complémentaires :

- B.W. positif en octobre
- Cellule LE positive
- **Antigène Australie positif** en septembre et jusqu'à sa mort.

2°/ Résultats de l'étude en microscopie électronique du sérum du 20 septembre 1971.

- Premier sérum Ag Au +, trouvé chez ce malade présentant un titre en E.I.D. au 1/10.

- La microscopie électronique révèle un aspect très particulier : une **grande richesse particulaire**. Les trois types de particules sont présents : rondes, tubulaires, en cocarde et quelques formes "en raquette" et on remarque un **pléomorphisme important** des particules rondes et des bâtonnets.

La répartition sur les grilles est **hétérogène** : environ 3 agrégats par champ microscopique de 30 à 70 particules et quelques microagrégats et particules libres en très petit nombre ; 100 % des particules d'Ag Au sont en agrégats.

- L'augmentation du voltage dans la technique d'E.I.D. afin de dissocier les complexes Ag Ac n'a pas changé le titre de l'Ag Au qui est resté au 1/10 ce qui traduit la stabilité de ces complexes.

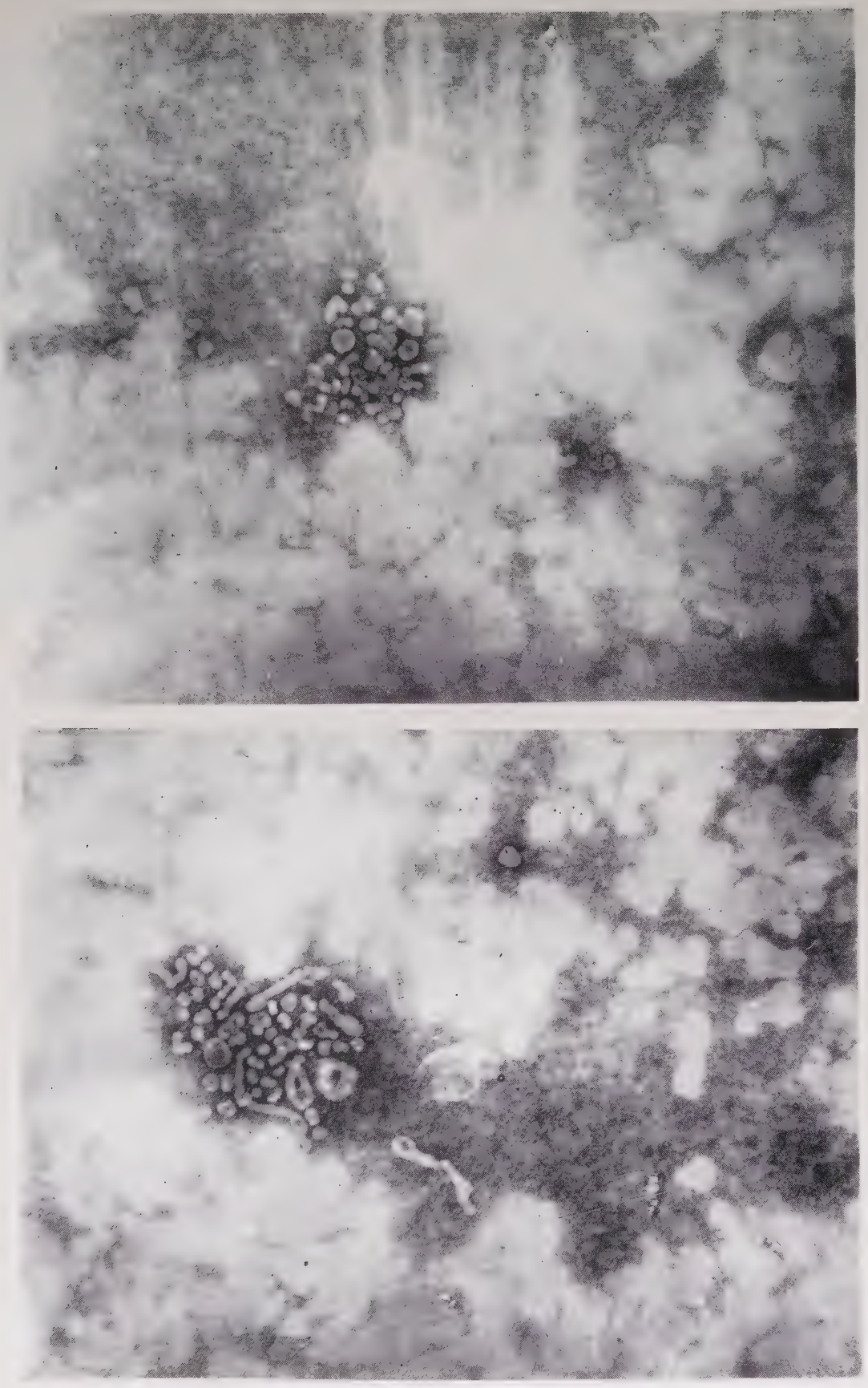
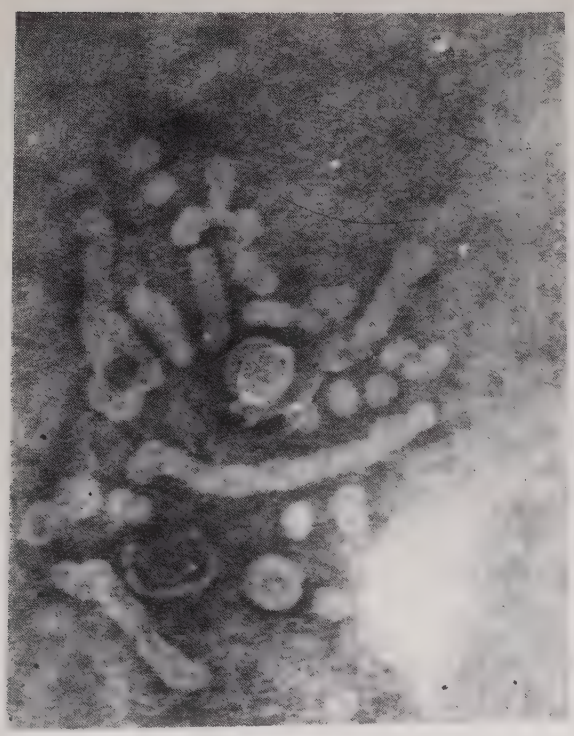


Planche 11 Sérum de M. DAH. maladie de Kaposi
Coloration négative au P.T.A. à 3 %
Grossissement : x 96.000

Répartition hétérogène sur la grille de M.E. des particules d'AgAu avec de très rares particules isolées. Ces agrégats correspondent à des complexes AgAc équilibrés ou en très léger excès d'AgAu



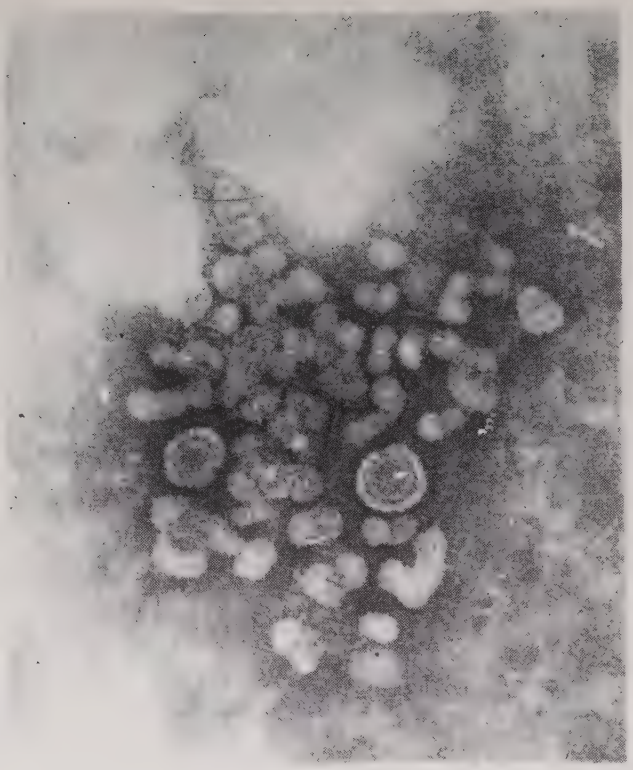


Planche 12 Sérum de M. DAH. maladie de Kaposi
Coloration négative au P.T.A. à 3 %
Grossissement : 240.000

Complexes Ag Au-Ac ; les trois types de particules sont présents mais avec un pléomorphisme tout à fait particulier pour les formes sphériques et tubulaires. Les cocardes conservent leur structures en double couronne ; la capside externe s'est ouverte pour la particule en haut à gauche.

CONCLUSION

Cette observation présente un grand intérêt à cause du contexte clinique, biologique et thérapeutique particulier. Une "collagénose" authentifiée répondant aux critères histopathologiques de maladie de Kaposi est associée à une "histologie d'hépatite" dans des conditions de chronologie non déterminée alors que parallèlement l'Ag Au est présent dans le sérum.

L'Ag Au dans le sang se présente sous l'aspect de complexes Ag Ac équilibrés ou en très léger excès d'Ag puisque des particules d'Ag sont trouvées isolées. Le nombre élevé de particules en cocarde est à rapprocher avec l'état immunitaire du sujet et la polychimiothérapie immunosuppressive reçue par le malade.

Le titre faible en E.I.D. n'est pas en accord avec la richesse en particules observées en microscopie électronique.

L'aspect de l'Ag-Au est semblable à celui observé dans le cas précédent (P.A.N.) mais le nombre de particules en cocarde est moins élevé et le pléomorphisme des particules rondes et tubulaires est ici caractéristique. Cet aspect, comme nous le verrons, paraît être d'un très fâcheux pronostic car il a été retrouvé dans les hépatites graves mortelles (6).

On est en droit d'invoquer le rôle pathogène des complexes Ag Ac anti Au qui sont ici en excès modéré d'Ag et capables de fixer le complément. La nocivité des complexes immuns a été démontrée dans des cas de maladies autoimmunes. Le rein représente l'organe cible privilégié pour ces dépôts de complexes immuns. Le syndrome néphrotique chez ce malade traduit des lésions glomérulaires qui peuvent être dues au dépôt de complexes Ag Ac dans la paroi des petits vaisseaux et aux phénomènes inflammatoires qui en découlent. La démonstration, au niveau du glomérule, d'Ag Au, d'Immunoglobulines et de complément en aurait été la preuve mais ni la biopsie rénale ni l'autopsie n'ont pu être réalisées.

Il est intéressant de rapprocher cette observation avec le cas de périartérite précédent ; en effet ces deux maladies semblent avoir un lien commun : leur état immunitaire particulier. Et, comme pour la périartérite noueuse, on peut penser que l'aspect de l'Ag Au dans le sang de ce malade atteint de maladie de Kaposi ne serait que le reflet d'une réactivité immunologique qui prédispose à l'infection par le virus de l'hépatite, à sa multiplication anarchique et intense, avec parallèlement une synthèse d'anticorps qui se maintient malgré l'inondation massive et soutenue de l'Ag dans le sang. La conséquence en est l'apparition dans le sang de complexes qui sont en très léger excès d'Ag et que l'**on peut incriminer directement dans l'atteinte rénale et la mort par urémie.**

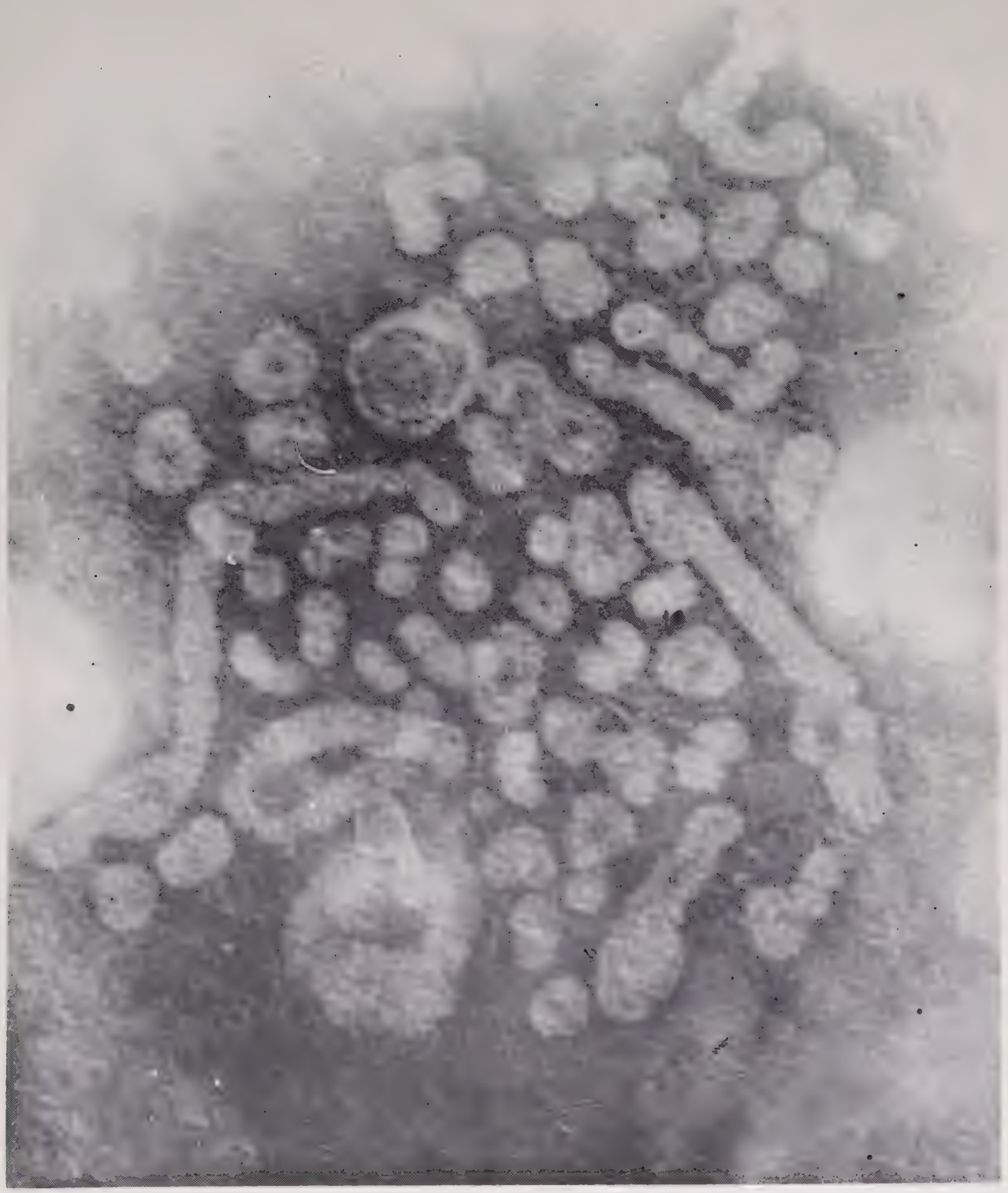


Planche 13 a Sérum de M. DAH. maladie de Kaposi
Coloration négative au P.T.A. à 3 %
Grossissement : 480.000

Un complexe AgAu-Ac

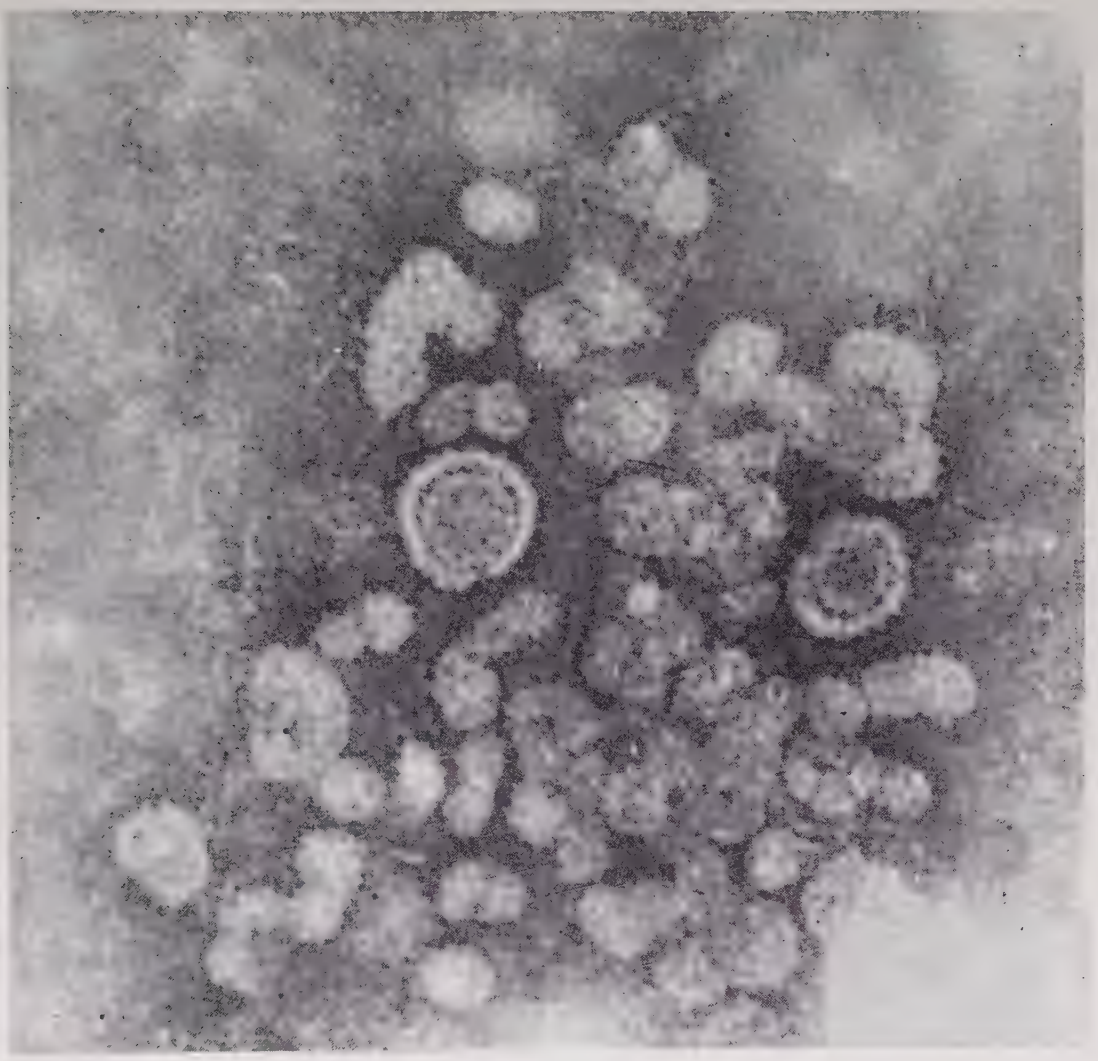


Planche 13 b Sérum de M. DAH.
Grossissement : x 480.000

La diversité des formes prises par l'AgAu est caractéristique et on peut observer en particulier la particule monstrueuse dans la planche 13 a (→). Toutes les formes présentes semblent constituées de sous-unités ; et l'hypothèse de la nature virale permet de comprendre que suivant le réarrangement des sous-unités, (c'est-à-dire des capsomères) les virions formés prendront l'aspect de particules tubulaires, sphériques ou en cocarde (virus complet). Le réarrangement des capsomères est ici anarchique avec des formes qui ne correspondent pas aux structures simples généralement trouvées. On remarque quand même que les cocardes paraissent normalement constituées.

HEPATITES CHRONIQUES

I - 1er cas

1°) Histoire de la maladie

M. PHA, 46 ans ne présente **aucun antécédent particulier** quand se déclenche en Mars 1970 une hépatite ictérique (transaminases : SGOT : 640 ; SGPT : 1420) qui semble évoluer favorablement lorsque surviennent en Mai puis Septembre 1970 deux rechutes.

La ponction biopsie hépatique effectuée en Décembre 1970 révèle une **sclérose portale** avec de nombreux néocanalicules biliaires. Une deuxième biopsie en Juin 1971 montre un aspect histologique inchangé.

Le malade est traité par les **corticoïdes** jusqu'en juin 1971 lorsque apparaît un syndrôme Cushingoïde qui nécessite l'arrêt de la corticothérapie.

Il survient un nouvel ictère fin Juin avec bilirubine à 220 mg/l. A partir du 1er Juillet, un traitement immunosuppresseur est entrepris (**Immurel**) à la dose de 1 comprimé et demi par jour et il est maintenu jusqu'en Décembre 1971. Le traitement est bien supporté par le malade tant sur le plan hématologique que sur son état général qui s'est amélioré.

2°) Résultats des examens biologiques, immunologiques et microscopie électronique

Le tableau 11 montre une évolution des transaminases en "dents de scie" correspondant aux prises successives du Cortancyl ; puis fin Juin 1971 une élévation des transaminases plus marquée et un nouvel ictère.

Plus de 10 recherches de l'Ag Au ont été réalisées entre Janvier et Mars 1971; elles ont toutes été négatives.

Le malade étant sorti de l'hôpital vers la mi-mars, la recherche suivante n'a pu être effectuée que le 1er Juin ; elle est positive avec un titre de 1/160 en EID. Le 18 Octobre, son titre est de 1/64 et il diminue au 1/40, le 6 Décembre.

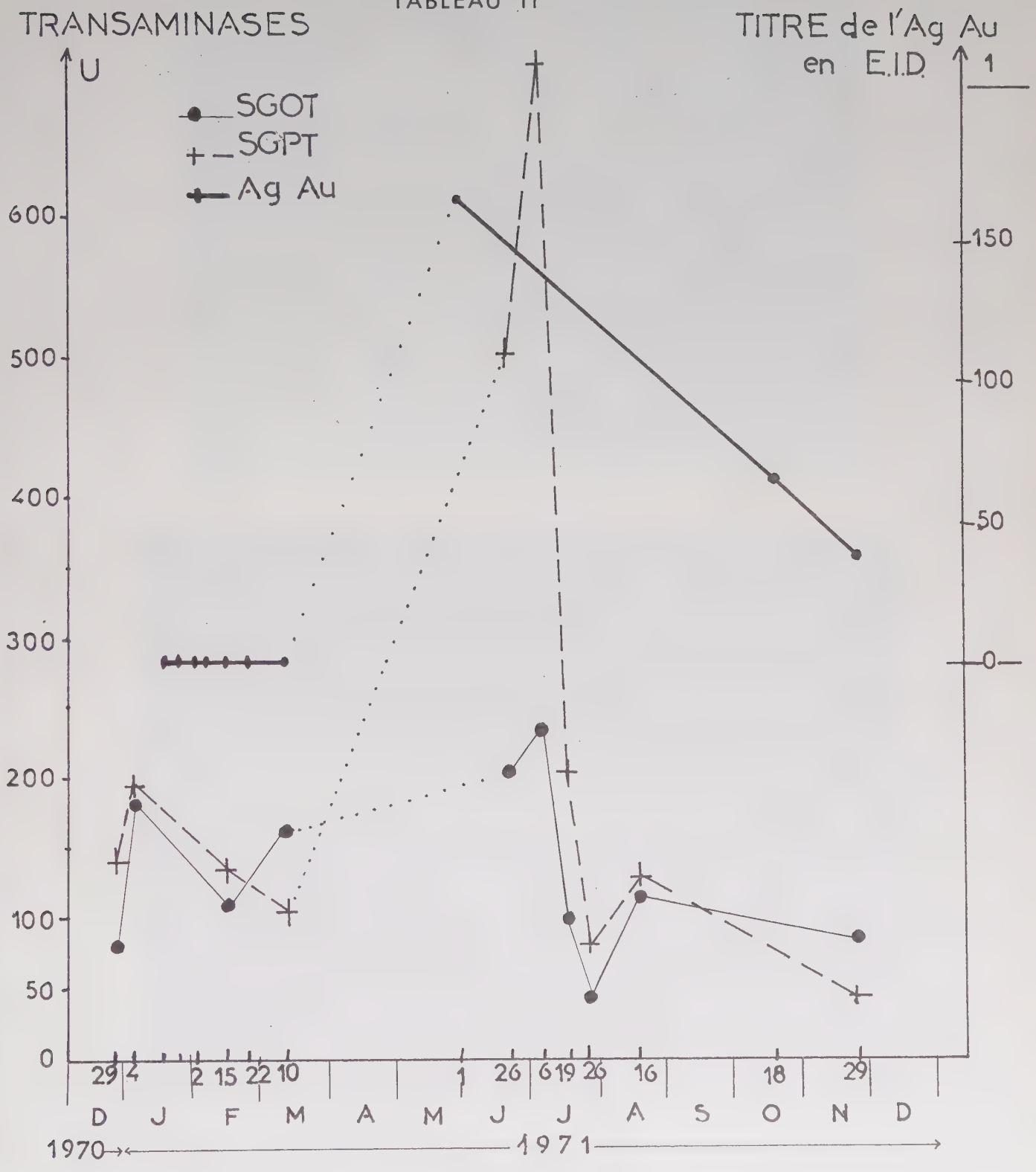
La M.E. (tableau 12) effectuée sur les sérums du 6 Juin 1971, 18 Octobre et 6 Décembre 1971, permet de voir que les 3 types de particules : rondes, tubulaires et en cocarde, sont présentes, toujours à **l'état dispersé**.

Les particules rondes et tubulaires ont des formes et des contours peu nets et montrent une altération accrue de ces aspects dans le dernier prélèvement. Le nombre de cocardes relatif croît lorsque le malade est sous Immuran ; leur morphologie et leurs dimensions restent inchangées dans les 3 sérums examinés.

3°) Apport de cette observation

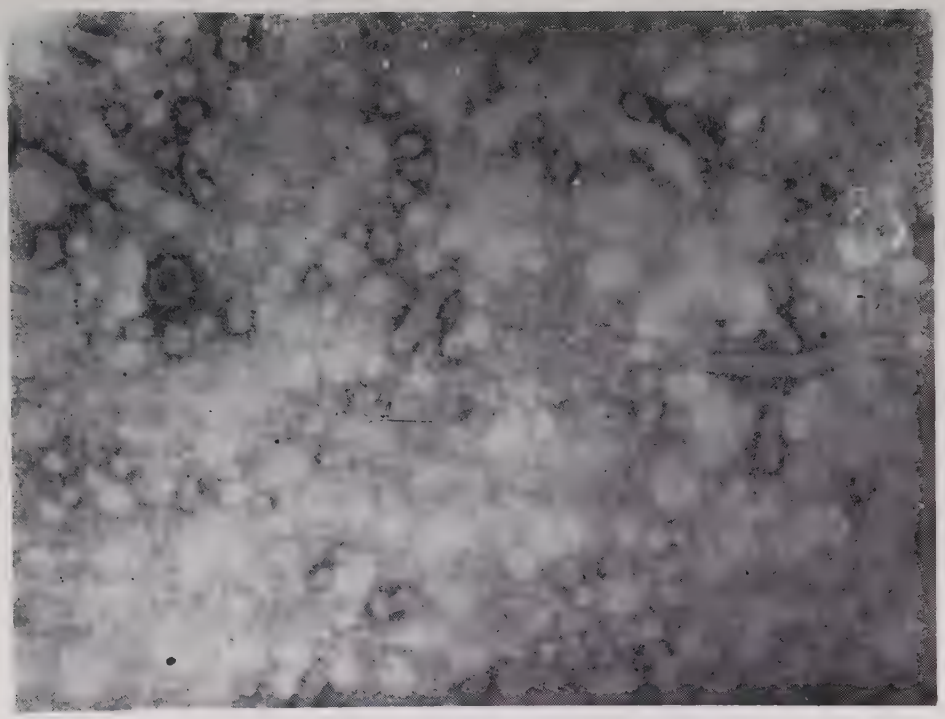
L'Ag Au n'est retrouvé dans le sérum qu'un an après le début de l'hépatite et sa libération dans le sang semble correspondre à la rechute qui se traduit au mois de Juin par un ictère intense et une augmentation nette des transaminases survenant après l'arrêt du traitement (corticoïdes).

TABLEAU 11



M. PHA - Hépatite chronique

a



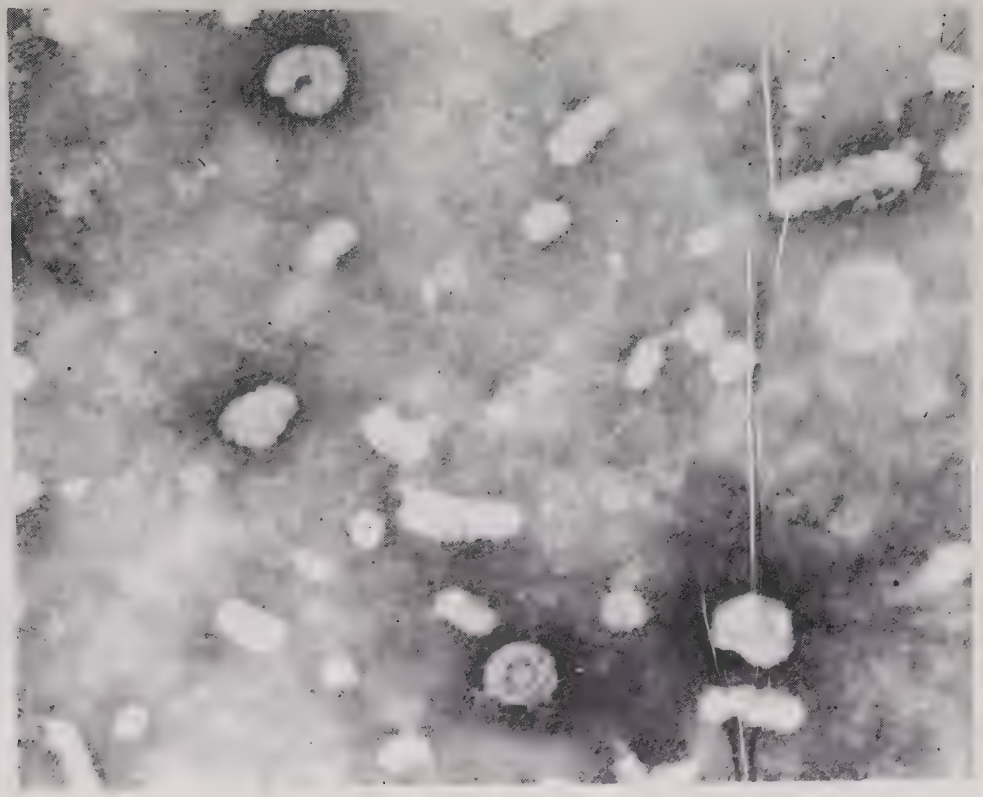
b

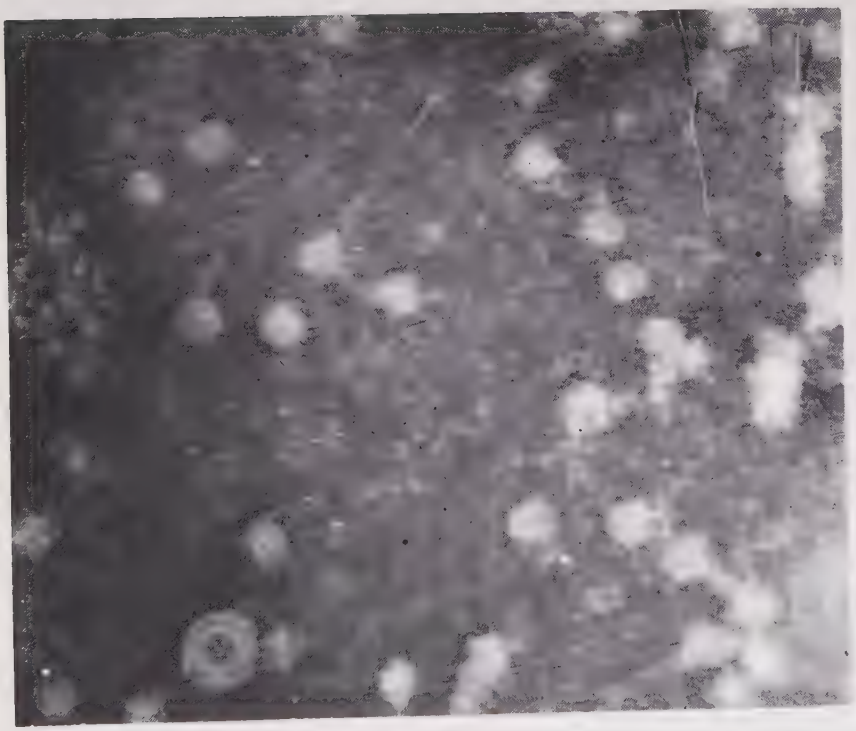
Planche 14 Sérums de M. PHA. Hépatite chronique
Coloration au P.T.A. à 3 %
Grossissement : (a) x 144.000 - (b-c-d) x 240.000
date des sérums (a) 1/6/71 - (b-c) 18/10/71 - (d) 6/12/71

La comparaison de l'AgAu à des dates différentes dans le temps chez un même sujet permet de voir les transformations progressives des différentes particules.

en (a) Aspect parfaitement structuré et régulier des formes tubulaires, sphériques ou en cocarde, de couleur grise avec des sous unités bien visibles.

c





en b et c 4 mois après dans le sang l'aspect des particules est différent, avec un contour moins net, une structure plus empâtée, assez difforme, de couleur blanche et de dimension plus importante.

en d l'Ag Au ne titre plus que 1/40 en E.I.D. les particules se fondent, se désagrègent et prennent un aspect cotonneux. On ne trouvent plus de particules "neuves" bien structurées ; seules les cocardes conservent encore une certaine structure apparente.

Ces aspects successifs sont caractéristiques d'un Ag Au en voie de disparition lente et bien en accord avec la diminution du titre de l'Ag Au. On peut suivre la transformation progressive de leur structure.

TABLEAU 12

Traitement et date des prélèvements	Répartition de particules présentes	Types de particules présentes	Nombre de particules en cocarde/champ microscopique	Pourcentage des cocardes/aux autres morphologies de l'Ag Au	Titre de l'Ag Au en E. I. D.
1 - 6 - 71 Cortancyl (depuis 3 mois)	Dispersées	- Rondes - Tubulaires - Cocardes	4 à 8	4 %	1/160
18 - 10 - 71 Immurel (depuis 3 mois)	Dispersées	- Rondes - Tubulaires - Cocardes	6 à 8	10 %	1/64
6 - 12 - 71 Immurel (depuis 5 mois)	Dispersées	- Rondes - Tubulaires très altérées - Cocardes présentes	3 à 5	non Chiffrable	1/40

M. PHA - Hépatite chronique

Un seul prélèvement a pu être effectué au mois de Juin et nous n'avons pas pu suivre l'évolution du titre d'Ag Au pendant cette période. Les prélèvements ultérieurs du 18/10 et du 6/12 semblent montrer que l'Ag Au tend à disparaître dans le sang car le titre décroît, les morphologie des particules rondes et tubulaires s'altèrent ; seules les cocardes gardent leur structure à peu près intacte.

Dans les 3 sérums examinés, les particules sont toujours restées dispersées et le nombre des "cocardes" a augmenté dans le deuxième sérum ; nous rapprochons ces 2 faits avec la thérapeutique immunosuppressive reçue par le malade.

II - 2ème cas

1°) **Histoire clinique**

M. MIX, 26 ans, Interne en pharmacie, originaire du Laos, ne présente pas d'antécédents particuliers quand, en Février 1970, se déclenche une hépatite qui se poursuit jusqu'en Octobre 1970, date à laquelle une ponction biopsie du foie révèle une histologie d'hépatite chronique persistante.

Le malade est mis sous Cortancyl de Juin à Septembre 1970 à raison de 30 mg/jour.

La recherche de l'Ag Au effectuée en Novembre 1970 par l'Institut Pasteur est négative. Les épreuves à la B.S.P. réalisées en Novembre et Décembre montrent une rétention nettement augmentée.

En Mars 1971, une nouvelle ponction biopsie du foie révèle la persistance d'une inflammation portale assez active, lymphoïde et sclérogène avec absence de cytolyse mais début de stéatose. A cette date, l'Ag Au est trouvé dans son sérum au cours de la recherche systématique de l'Ag Au sur les prélèvements de sang envoyés au laboratoire pour "bilan hépatique".

Les épreuves à la B.S.P. en Juin et Août 1971 montrent toujours une épuration très diminuée.

2°) **Résultats des examens biologiques, immunologiques et M. E.**

rapportés dans le tableau n° : 13

Ces courbes permettent de suivre les variations des transaminases : après le pic important en Mars 1970, on remarque un retour lent et progressif vers la normale.

L'Ag Au est trouvé pour la première fois le 15 Mars 1971, à un titre de 1/64 en E.I.D. Il se maintient à un titre rigoureusement constant jusqu'au 13 Décembre 1971, date du dernier examen.

L'aspect en M.E. est très particulier, **rigoureusement constant dans le temps.** Les grilles montrent une grande richesse en particules toujours dispersées.

- 50 % de formes en cocarde (38-40 nm). La morphologie de ces particules laisse apparaître une double couronne constituée chacune de petites masses et nous discuterons plus loin la signification de ces structures.
- 5 à 15 % de petites particules rondes
- 1 à 5 % de très longs bâtonnets flexueux, bien structurés.

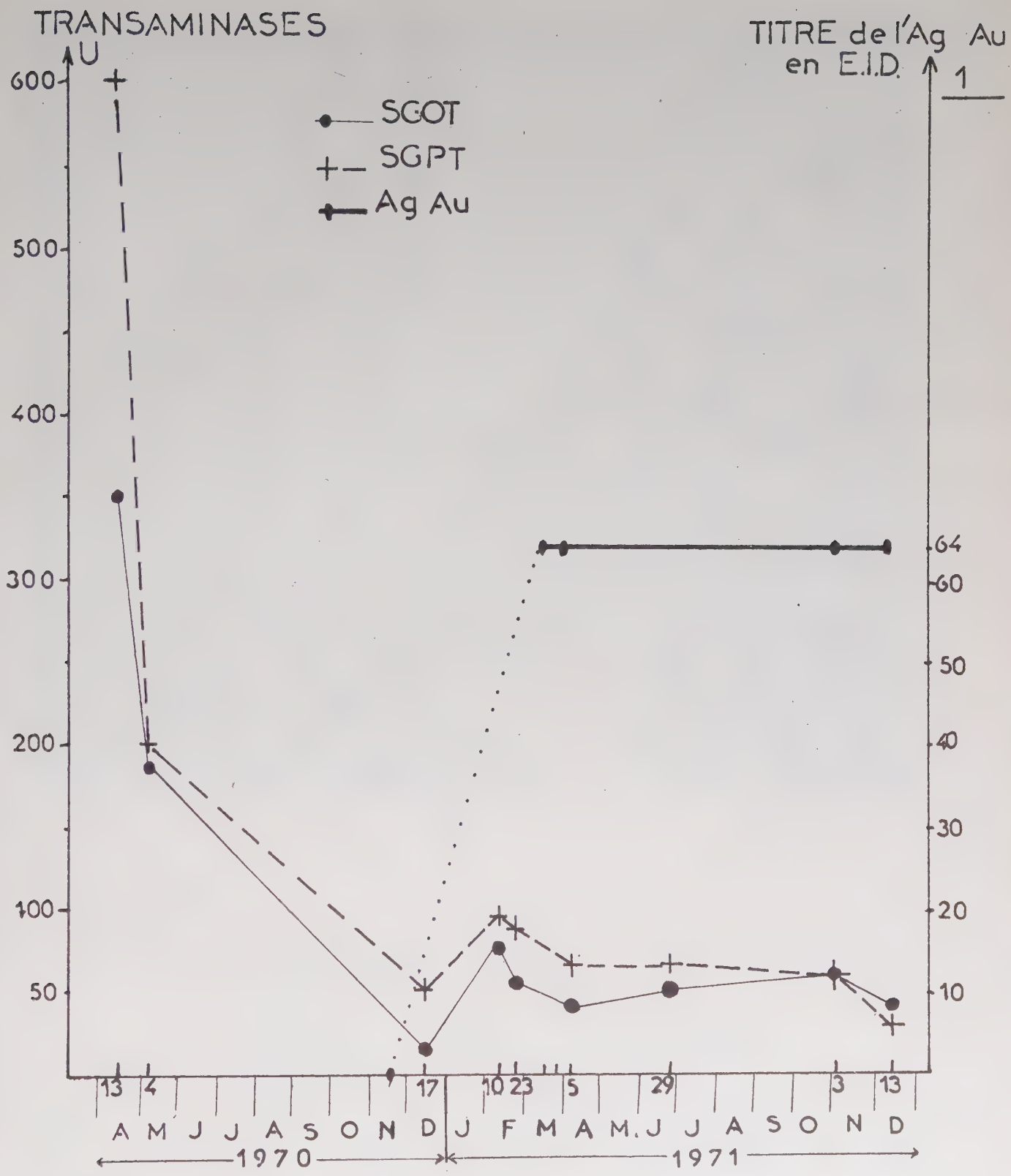


TABLEAU 13 - M. MIX - Hépatite chronique

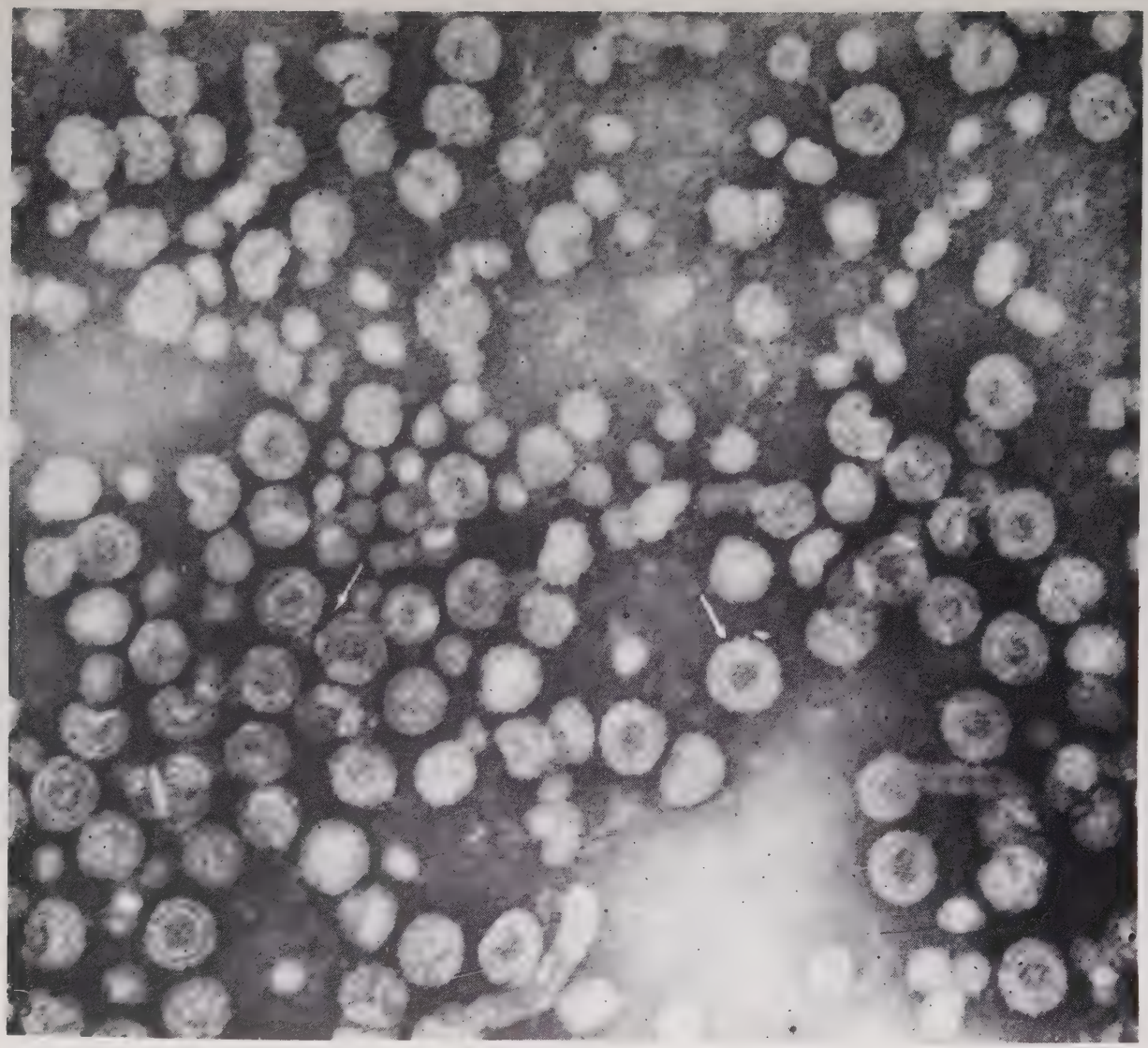


Planche 15 a Sérum de M. MIX Hépatite chronique, le 15/3/71
La centrifugation a porté sur 1 ml de sérum
Coloration au P.T.A. à 3 %
Grossissement : x 240.000

Plus de 50 % de l'AgAu est représenté par des cocardes dont la structure est particulièrement visible. Deux couronnes concentriques constituées chacune de masses indépendantes rappelant des capsomères. L'aspect géométrique, en pentagone et surtout en héxagone, des 2 couronnes est visible pour de nombreuses particules.
D'autres ont un aspect plus compact et permettent de comprendre dans l'espace la structure réelle : 2 capsides icosaédriques concentriques entourant un centre contenant un nucléoide d'acide nucleïque.

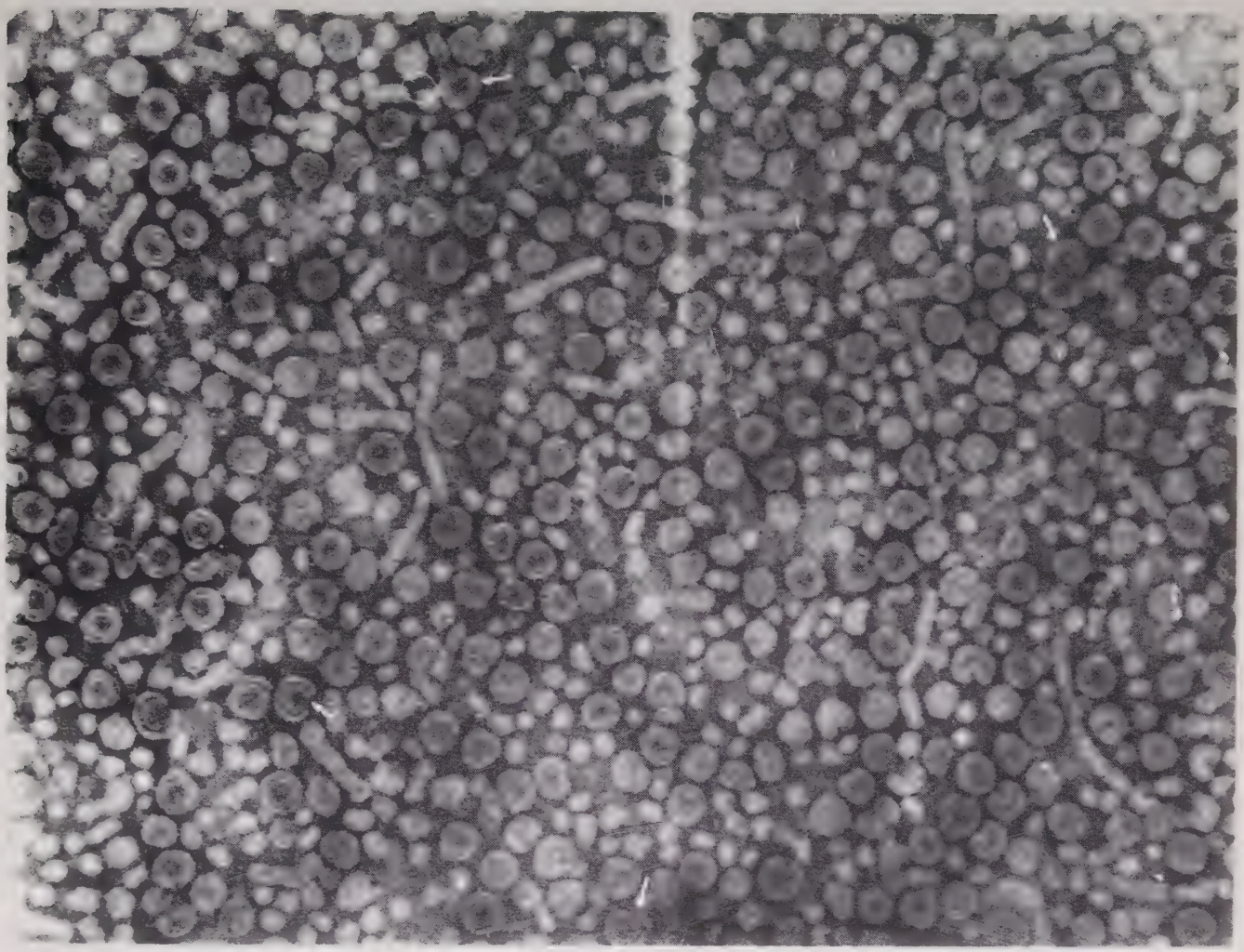


Planche 15 b M. MIX Hépatite chronique, le 13/12/71
la centrifugation a porté sur 1 ml de sérum
Coloration au P.T.A. à 3 %
Grossissement : x 144.000

Les grilles montrent une densité de particules très importante ; de nombreux stades de maturation et de dégradation sont visibles avec des formes intermédiaires et anarchiques. (➞)

M. MIX Hépatite chronique, le 13/12/71
La centrifugation a porté sur 0,1 ml de sérum.
Coloration au P.T.A. à 3 %
Grossissement : x 240.000

Les trois types de réarrangements structuraux des capsomères dans l'espace sont ici bien représentés :

Une quatrième forme de l'Ag Au est retrouvée dans les sérums de ce malade, d'aspect bien particulier, intermédiaire entre les cocardes et les bâtonnets, que nous avons dénommée "forme en raquette, en haltère, en têtard". Ces divers aspects nous ont permis de faire un grand pas dans la connaissance de la structure de l'Ag Au et dans les rapports entre les différentes formes structurales de l'Ag Au.

3°) **Examens complémentaires effectués sur les sérums de ce malade.**

Nous avons réalisé une étude d'agrégation artificielle des particules d'Ag Au présentes dans le sang de ce sujet.

1 - **Mode opératoire**

a) Anticorps anti Au utilisés : au nombre de 3.

. Deux sérums anticorps anti Au comprenant notre Ac de référence (titrant 1/32 en ID) et un autre sérum anticorps titrant 1/10 en ID

. 1 gamma globuline anti Au préparée par la technique à l'acide caprylique.

b) Technique. Nous avons mis à incuber des quantités variables d'anticorps anti Au et de sérum Ag pendant des temps différents. Entre 1 heure à 37° (0,9 ml de sérum Ag + 0,1 ml de sérum anticorps) et 10 minutes à 37° (0,1 ml de sérum Ag et 0,9 ml de sérum Ac). Puis les sérums ont été traités dans les conditions normales pour l'observation en microscopie électronique.

2 - **Résultats**

Deux constatations :

a) Suivant la quantité d'Ac additionnée au sérum Ag les images sont différentes :

. Avec un minimum d'Ac (0,1 ml) les particules sont réparties d'une manière régulière, accolées les unes aux autres sous la forme d'un tapis. (Planche 16 a)

. En quantités croissantes d'Ac, une hétérogénéité de répartition commence à apparaître et le contour et la morphologie des particules sont moins nets ; (Planche 16 b)

Avec 0,9 ml d'Ac des amas bien individualisés sont visibles de 20 à 100 structures par agrégat présent à raison de 20 à 30 par grille. (Planche 16 c)

b) Alors que le sérum Ag Au traité dans les conditions normales présentait 80 % de "cocardes", après addition d'Ac anti Au, le pourcentage diminue à 20 puis 5 % avec des quantités croissantes d'Ac ; cette constatation très importante permet de tirer deux conclusions :

1) Une évaluation d'un pourcentage de particules d'un type donné ne peut devenir un élément de comparaison que si tous les sérums sont traités rigoureusement dans les mêmes conditions.

2) L'addition d'Ac anti Au permet de recueillir sur les grilles toutes les particules rondes plus légères et est un moyen de sensibiliser la technique de microscopie électronique lorsqu'elle est utilisée dans un but diagnostic de recherche de l'Ag Au.

4°) **Apport de cette observation**

La contamination par le virus de l'hépatite paraît s'être effectuée par voie non parentérale (il n'y a pas de notion d'inoculation) ; mais, par son travail, le sujet est en contact avec le sang de malades.

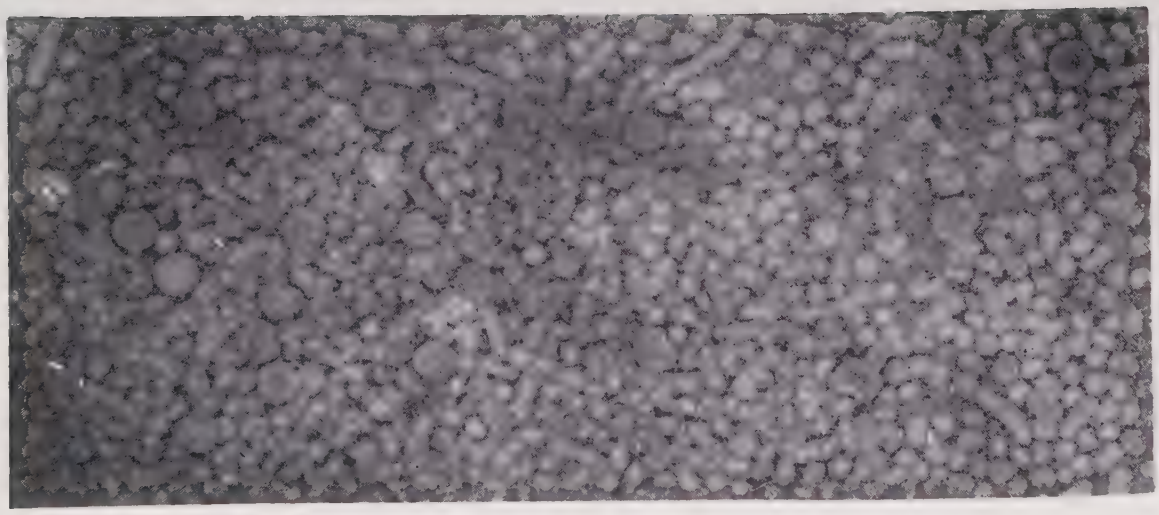


Planche 16 Grossissement : x 144.000
Agrégation artificielle des particules d'AgAu par un Anticorps anti Au.

0,1 ml d'anticorps + 0,9 ml de sérum AgAu, 10 minutes à 37°

En a et b deux aspects différents de la répartition des particules d'AgAu sur les grilles.
Elles sont réparties en un tapis, accolées les unes aux autres et formant un véritable réseau (les particules paraissent toutes dans un même plan). Les formes en cocarde ne sont pas "prises" dans le réseau mais en font bien partie intégrante.
Toutes les particules présentes supportent bien l'antigénicité Australie

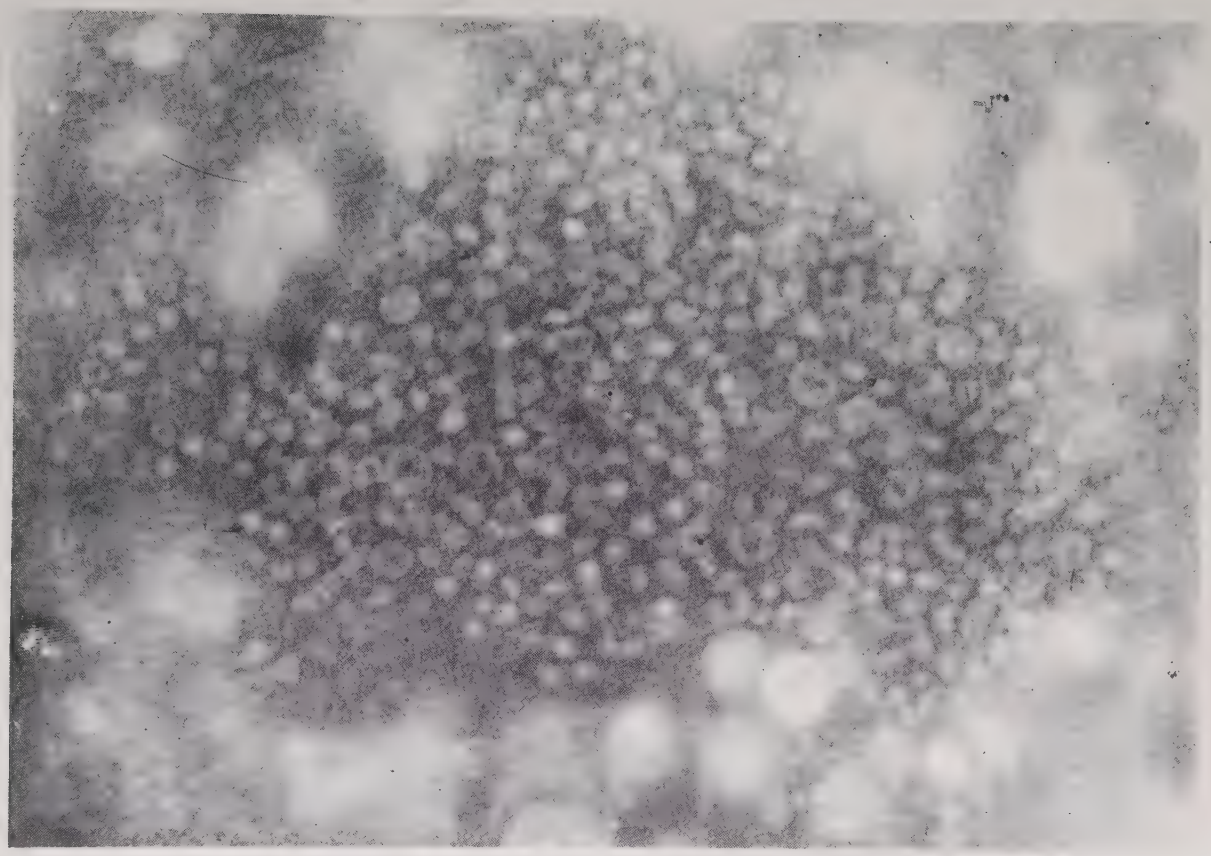


Planche 16 (suite) Grossissement : x 144.000

Agrégation artificielle des particules d'Ag Au par un anticorps anti Au.
0.9 ml d'anticorps + 0,1 ml de sérum Ag Au, 10 minutes à 37°.

En c, on peut voir un agrégat de particules ; la répartition sur la grille est totalement hétérogène et l'examen des 5 grilles n'a pas permis de trouver de particules isolées : on est bien en excès d'Ac. Les particules sont dans un seul plan, mais l'excès d'anticorps masque les structures.

- L'Ag semble n'avoir pas été libéré au début de l'hépatite puisque sa recherche en I.D. était négative en Novembre 1970, constatation à raprocher de l'observation précédente.

- La ponction biopsie du foie montre une évolution sclérogène, la diminution de l'épuration du foie étant confirmée par la B.S.P.

- Les formes structurales rencontrées de l'Ag Au et leur constance semblent indiquer un lieu de synthèse non tributaire de lyses cellulaires brutales, c'est-à-dire extrahépatique.

(Par ailleurs nous remarquons que le sujet a été traité par les corticoïdes de Juillet à Décembre 1970 et l'Ag Au a été retrouvé 3 mois après avec 80 % de formes en cocardes).

Deux constatations s'imposent : d'une part la finesse des structures des particules, les aspects en raquette et autres formes intermédiaires entre les tubules et les cocardes et, d'autre part, leur dispersion totale permet de penser que ce sujet présente un état immunitaire particulier avec réponse de type humorale diminuée ou peut-être absente.

III - 3ème cas

1°) Histoire clinique

M. GAR, 22 ans, entre à l'hôpital le 23 Novembre 1970 pour un ictère cutanéomuqueux franc dont le début remonte au 2 Novembre. L'interrogatoire révèle une **toxicomanie par piqure de morphine.**

- La recherche de l'Ag Au effectuée le 26 Novembre au Centre départemental de Transfusion Sanguine est **positive.** Une corticothérapie est entreprise le 5 Décembre, mais la prise des médicaments par le malade est incertaine à partir du mois de Janvier. L'ictère disparaît le 28 Décembre alors que les transaminases **restent** toujours élevées.

- Des examens répétés permettent de voir la persistance de l'Ag Au à des titres sensiblement constants. Les transaminases **restent** augmentées jusqu'en Novembre 1971 (derniers examens effectués).

2°) Résultats des examens biochimiques et en M.E. (tableau n° 14 et n° 15)

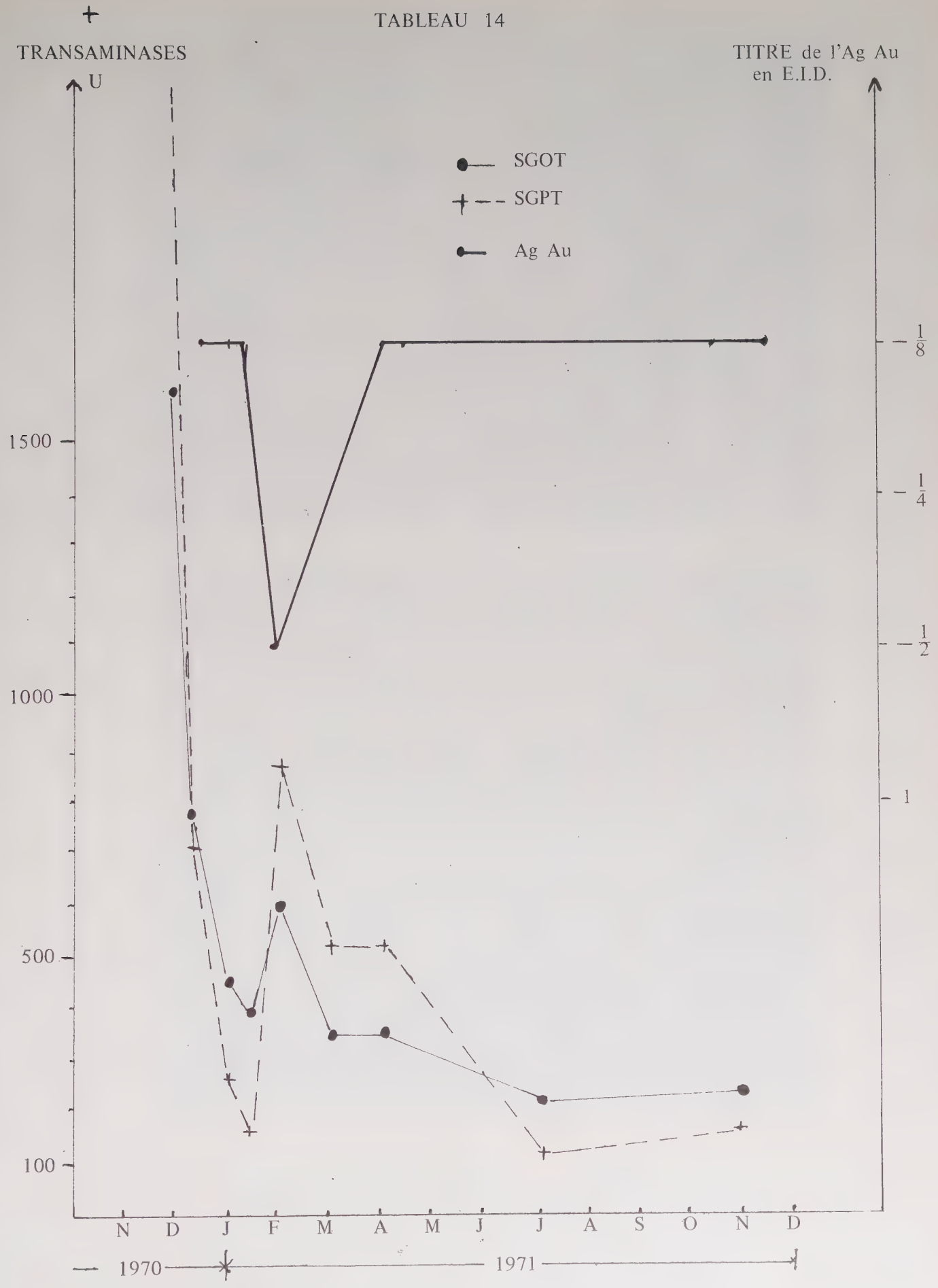
On note une élévation des transaminases en Février puis une diminution et maintient à un titre constant jusqu'en Novembre 1971. Les titres de l'Ag Au sont faibles et à peu près constants avec une diminution momentanée le 16 Février.

Les particules tubulaires sont retrouvées au début en majorité et agrégées entre elles en microagrégats ; puis deux mois plus tard on constate l'apparition brutale d'agrégats de 20 à 100 particules constituées pour 98 % de particules rondes, bien structurées ; et curieusement le titre de l'Ag Au diminue. (EID→1/2).

La dispersion des particules est totale en Octobre et se maintient jusqu'en Novembre. Les particules rondes y sont en majorité.

Sur tous les prélèvements observés en M. E., nous n'avons pas pu identifier une seule particule en cocarde.

TABLEAU 14



M.GAR. - Hépatite chronique.

a

b

Planche 17 M. GAR. Hépatite chronique (hépatite de la seringue)
Grossissement : (a) x 144.000 - (b) x 96.000

(a) Le sérum du 16/2/71. L'Ag Au est réparti sur les grilles de manière hétérogène avec 98 % de formes rondes agrégées entre elles pour former un réseau. En agrégats de 15 à 200 éléments représentant des complexes en excès d'Ag.

Le titre de l'Ag Au est paradoxal avec la grande richesse particulaire sur les grilles. (1/2 en E.I.D.) mais se comprend aisément étant donnée la répartition totalement hétérogène et stable de l'Ag Au.

(b) sérum du 12/11/71

Les éléments sont répartis de manière homogène sur la grille avec 85 % de formes rondes et 15 % de bâtonnets.

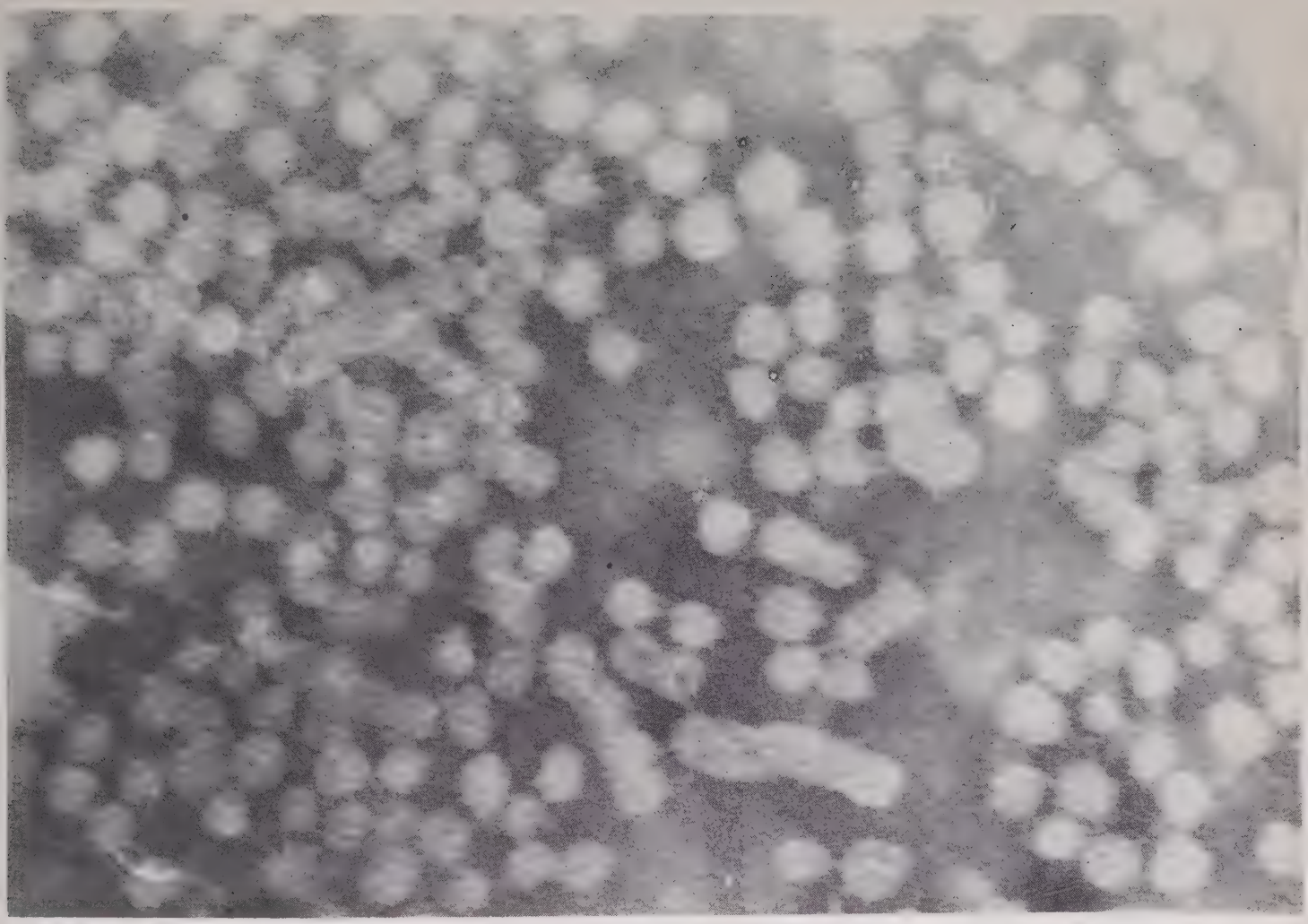


fig. 17 c M. GAR. Hépatite chronique (hépatite de la seringue)

Grossissement : x 480.000

En c sérum du 16/2/71 une partie d'un complexe Ag Au ; on aperçoit les jonctions filamenteuses entre les différentes particules correspondant selon toute vraissemblance à des molécules d'immunoglobulines (anticorps anti Au).

3°) **Apport de cette observation**

Hépatite d'inoculation dont l'Ag Au a été identifié au cours d'une recherche effectuée 1 mois environ après le début de l'ictère.

Pour ce malade, suivi pendant un an, nous n'avons jamais pu identifier de "cocardes", statistiquement sur le nombre de particules identifiées (5 sérums examinés, soit 25 grilles, c'est-à-dire plus de 5.000 champs microscopiques) c'est-à-dire 500.000 particules environ, nous pouvons conclure à l'absence de cocardes dans le sang de ce malade suivi pendant 12 mois :

- La diminution du titre de l'Ag Au en Février 1971 est en contradiction avec le nombre nettement augmenté de particules sur les grilles. Elles sont toutes en agrégats de 15 à 100 et plus. Des essais de titrage à plus haut voltage n'ont pas permis de dissocier ces complexes (le titre étant resté le même : 1/2).

- L'apparition de toutes ces formes rondes semblerait résulter d'une lyse cellulaire accrue momentanée correspondant avec la remontée transitoire des transaminases en Février, (cf. tableau 14).

- La corticothérapie subie par ce malade étant assez incertaine, nous ne pouvons en tenir compte.

- L'hétérogénéité de répartition des particules au début de l'évolution, puis la dispersion en dehors de toute thérapeutique immunosuppressive semble traduire la diminution de réponse humorale et aboutit à une véritable paralysie immunitaire par **inondation** progressive et répétée de l'Ag Au.

TABLEAU 15

Dates des prélèvements et traitements	Répartition des particules d'Ag Au sur les grilles	Types de particules présentes	Titre de l'Ag Au	
			en E. I. D.	en I. D.
17 - 12 - 70 Cortancyl	Hétérogène : microagrégats de 2 à 4 tubules	- 95 % /Tubules - 5 % / P. E. - Absence de cocardes	1/8	1/8
30 - 12 - 70 Cortancyl	Hétérogène : microagrégats de particules rondes et tubulaires	- 85 % Tubules - 15 % Rondes - Absence de cocardes	1/8	1/4
4 1 71			1/8	1/4
16-2-71	Hétérogène : agrégats de 15 à 100 particules rondes	- 2 % de tubules très courts - 98 % de rondes - Absence de cocardes	1/2	1/2
30-3-71			1/8	1/4
8-4-71			1/8	1/4
14-10-71	- Dispersées	- 5 % tubules - 95 % rondes - absence de cocardes	1/8	1/4
12-11-71	Dispersées	- 15 % tubules - 85 % rondes - absence de cocardes	1/8	1/4

CIRRHOSE ET HEPATITE

I - 1er Cas

1°) **Histoire clinique**

M. BOU, 47 ans, est entré dans le service du Professeur Loeper le 27 Mars 1971 pour hémorragie digestive par hypertension portale.

Il est envoyé en chirurgie et reçoit des transfusions. Rapidement apparaît un ictère cutanéomuqueux léger sans prurit. La recherche de l'Ag Au effectuée le 20 Avril est positive. Le malade présente des antécédents d'éthylisme et de tuberculose pulmonaire à 14 et 30 ans. La perturbation des bilans hépatiques traduit une cirrhose (très forte hyperglobulinémie avec facteur rhumatoïde positif).

2°) **Résultats des examens immunologiques et M.E.**

Cinq prélèvements ont été étudiés en E. I.D.

le 20/4/71	titre 1/20
le 12/5/71	" 1/10
le 25/5/71	" 1/4
le 7/6/71	" 1/2

L'observation au M.E. du sérum du 20/4/71 montre de nombreuses particules tubulaires (4 à 5/champ), longues et flexueuses et des particules rondes à l'état dispersé. Quelques cocardes ont été identifiées : 1 pour 200 particules.

II - 2ème Cas

1°) **Histoire clinique**

M. COS, 49 ans, portugais résidant en France depuis 14 ans, possède des antécédents de tuberculose pulmonaire en 1961, une tumeur cutanée opérée en 1968 et un éthylisme certain.

Il est hospitalisé dans le service du Professeur Decroix pour une pleurésie hémorragique à éosinophiles (74%) et une éosinophilie sanguine à 18 %, en Février 1971.

Dès son entrée, on remarque une **hépatite ictérique**, avec Ag Au positif le 16 Mars 1971 avec un titre faible.

L'Ag Au disparaît deux mois après mais l'élévation des transaminases persiste jusqu'en Septembre, date à laquelle le malade est réhospitalisé dans le service du Professeur Sarrazin. Une laparoscopie et une biopsie hépatique révèlent une sclérose importante. Le malade devait sortir peu après.

2°) **Microscopie électronique**

Le prélèvement du 10/4/71 a été examiné et s'est révélé très pauvre en éléments. Nous avons observé la présence de particules rondes et de particules tubulaires le plus souvent agrégées entre elles :une ronde pour 4 tubulaires et 5 particules par champ. Nous avons remarqué de rares particules en cocarde : 1 pour 10 champs.

III - 3ème Cas

1°) **Histoire clinique**

M. GEO, 66 ans, est entré dans le service du Professeur Loeper le 24 Mai 1971 pour un ictère. Les examens effectués ont révélé une hépatite et la biopsie hépatique réalisée le 18 Juin a montré une histologie de cirrhose avec signe d'hépatite cytolytique et discrète cholestase.

La recherche de l'Ag Au, le 25 Mai 1971, est positive au 1/5 en E.I.D. et le 1er Juin, au 1/1. Les 9 et 18 Juin, de nouvelles recherches effectuées en E.I.D. étaient négatives.

2°) **Microscopie électronique**

Le sérum du 25/5/71 montre un très petit nombre de particules présentes sous les 3 morphologies : rondes (agrégées par 3 ou 4), tubulaires (très rares), et en cocarde (1 par champ).

CONCLUSION

. Ces trois malades présentent un tableau sensiblement identique.

. Deux sur trois ont des antécédents d'éthylisme certain ; pour le troisième, une incertitude reste.

. Tous montrent une cirrhose (découverte à l'occasion d'un ictère) sur laquelle s'est greffée une hépatite avec Ag Au positif.

. L'ictère est d'origine post-transfusionnel dans un cas et indéterminé dans les 2 autres.

. Les 3 malades n'ont jamais reçu de corticoïdes ni aucun médicament immunosuppresseur.

L'Ag Au est détecté dès l'entrée à l'hôpital dans les 3 cas à un titre faible qui diminue ensuite, l'Ag Au disparaît peu de temps après.

Tous les trois possèdent des particules en cocarde en nombre relatif particulièrement élevé : dans un cas (10 %) et faible dans les 2 autres cas : 1/2000 et 1/500 particules.

HEPATITES AIGUES "BANALES"

En milieu hospitalier, il est peu courant de trouver des sujets ayant un simple "ictère viral" sans autre pathologie. Parmi les cas d'hépatite que nous avons pu suivre et dont nous avons pu étudier les sérums, nous en rapportons deux qui résument les différents "aspects" de l'Ag Au :

- l'une **à évolution rapide**, en 15 jours
- l'autre **à évolution plus prolongée** : 5 mois.

1°) **1er Cas**

a) **Histoire clinique et examens biologiques**

M. NIC, est hospitalisé le 17 Décembre 1970 pour une hépatite ictérique avec transaminases élevées de façon transitoire sans antécédents particuliers : l'Ag Au est positif dès la première recherche au 1/20 en E.I.D.

Le 30.12.70, l'Ag Au est au 1/8 en E.I.D. (avec SGOT : 33 UI et SGPT : 170 UI)

Le 9.1.71, les transaminases sont redevenues normales et l'Ag Au a disparu du sérum.

b) **Microscopie électronique**

Sur le sérum du 17.12.70, on note :

- 1 à 5 particules par champ microscopique avec 90% de particules rondes et 10% de particules tubulaires.

- l'absence de cocardes sur les cinq grilles examinées et la dispersion des particules sur les grilles.

Ce cas représente le tableau de la majorité des hépatites "banales" :
apparition de l'Ag Au dans le sang de manière fugitive à un titre assez faible et négativation rapide (en 15 jours).

L'Ag Au est représenté par deux types de particules, rondes et tubulaires, l'absence de formes en cocarde et la dispersion des particules d'Ag Au dans le sang.

II° / 2ème Cas

1) **Histoire clinique**

M. ROC, 64 ans, à l'occasion d'une prostatectomie le 17 Juin 1971 reçoit une transfusion préopératoire.

Le 1er Octobre, apparaissent les premiers symptômes d'une hépatite avec fièvre, dorsalgie, mais absence de céphalées, d'urticaire et de troubles digestifs. 5 jours plus tard se manifeste un ictère intense (bilirubine : 380 mg), transaminases très élevées : SGOT : 3600 UF, SGPT : 6400 UF)

Il reçoit 50 mg/jour de Solupred

La première recherche de l'Ag Au, le 7 Octobre, est positive.

L'ictère régresse rapidement, les transaminases redeviennent normales.

Le 26 Octobre, nouvelle rechute, et hospitalisation dans le service du Professeur CAROLI.
Il reçoit du Synacthère du 10 au 15 Novembre. Les transaminases se maintiennent à un taux peu élevé de 100 à 300 U. jusqu'en janvier 1972. La première biopsie effectuée en Décembre 1971, révèle des lésions de cytolyse avec un caractère aigu de l'infiltration cellulaire et de l'ictère tissulaire.
La dernière biopsie hépatique montre une image d'intense restauration hyperplasique en fin d'évolution d'une hépatite sévère qui ne paraît pas devoir être sclérogène.

2) **Résultats de l'étude immunologique et en microscopie électronique**

- l'Ag Au trouvé dans la circulation dès le 7 Octobre (1/40 en EID) voit son titre augmenter jusqu'au 1/160 le 5 Novembre et se maintient à ce titre jusqu'au 6 Janvier 1972 (dernier prélèvement étudié). (tableau 16)

- Les 3 types de particules sont présents, répartis d'une manière hétérogène et le pourcentage des particules agrégées diminue dans le temps de 40 % à 3 %.

- Les particules sont parfaitement structurées :
  . les formes rondes sont de taille uniforme et centrées.
  . les formes allongées ont l'aspect de tubules.

On distingue deux types de complexe :

- l'un avec particules en cocarde, volumineux, avec un nombre que nous avons évalué de 100 à 1000 particules par agrégat. Les mensurations les plus importantes atteignent 1,5 à 2 microns de diamètre. (planche 18)

- l'autre, de taille plus réduite (10 à 30 particules) comprenant les trois types de particules.

C'est une hépatite post transfusionnelle vraisemblablement déclanchée cinq mois après la transfusion reçue, à évolution prolongée puisque cinq mois après les premiers symptômes les transaminases sont toujours élevées. L'état de l'Ag Au dans le sang est particulier : en effet, 20 % des particules sont représentées par des cocardes qui sont en partie agrégées sous forme de volumineux complexes.

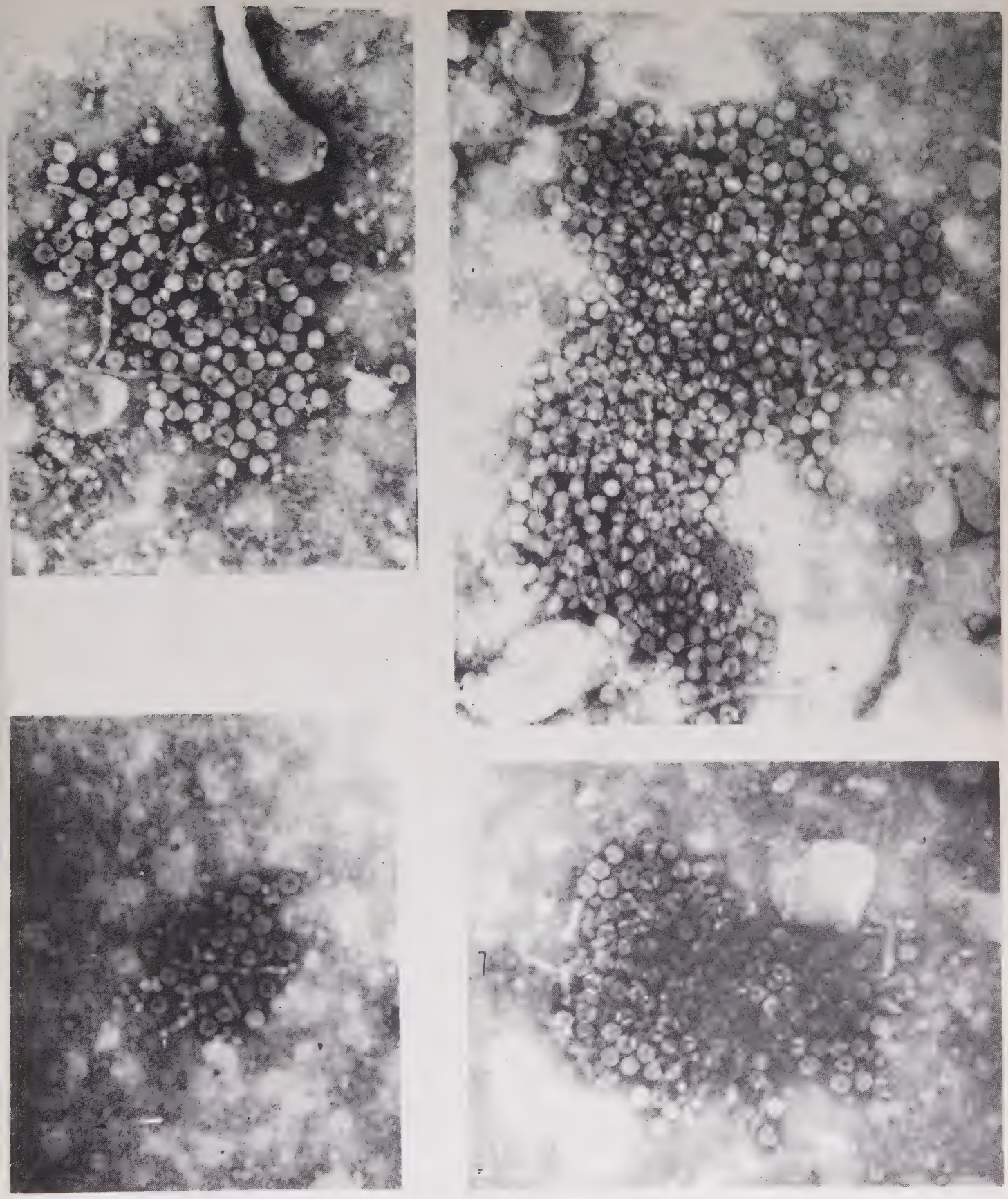


Planche 18 Sérum de M. ROC.
Hépatite post transfusionnelle
Grossissement : x 96.000

Exemples de quelques agrégats de particules provenant des prélèvements des 7/10/71 et 27/10/71 le plus volumineux en haut à gauche est constitué de près de 500 cocardes et mesure 1,5 micron de long. En bas à droite un complexe mixte.

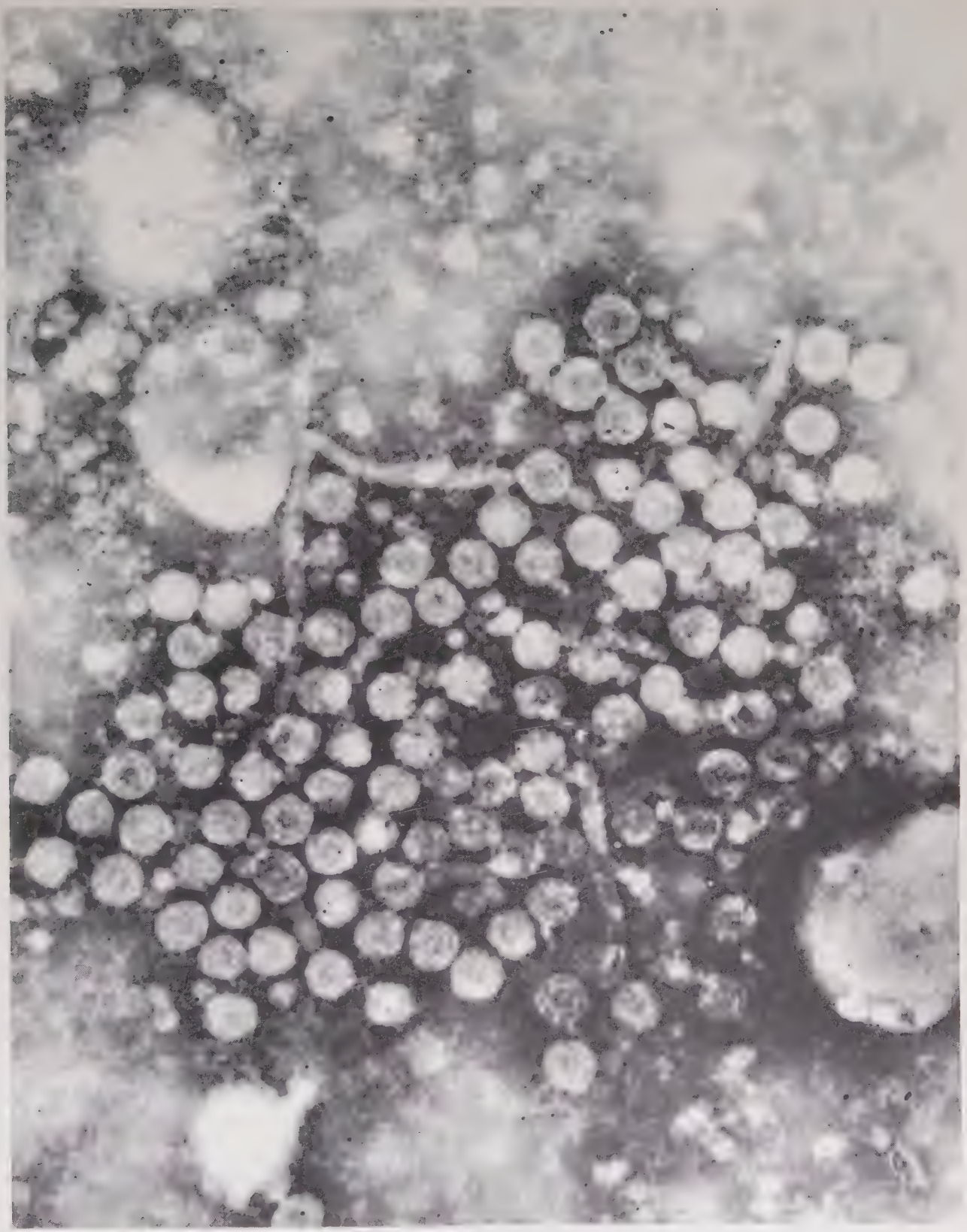


Planche 18 (suite) M. ROC.
Hépatite post transfusionnelle.
Grossissement : x 240.000

Agrégat de cocardes dans le prélèvement de sang du 27/10/71.

La disparition progressive de l'hétérogènéité de répartition de l'Ag Au sur les grilles en fonction du temps typifie ce fait que nous avons observé dans d'autres cas. Nous devons tenir compte que le sujet a reçu, dès le début de son hépatite, 50 mg par jour de Solupred, puis des perfusions d'ACTH de synthèse au mois de Novembre, médications qui ont pu déprimer l'immunité de ce sujet.

CONCLUSION :

Ces deux cas représentent les aspects extrêmes que nous avons rencontrés dans les hépatites à évolution "normale".

Dans les cas d'hépatites bénignes postfransfusionnelles étudiés seulement par la recherche immunologique de l'Antigène Australie, sans étude en microscopie électronique, nous avons pu constater, en procédant à des recherches itératives de l'Ag Au, que la disparition de l'Ag Au du sang circulant précède habituellement la guérison de l'hépatite, guérison complète dans ces cas négativés, sans séquelle clinique ni biologique.

Dans certaines observations où l'évolution de l'ictère a été très prolongée (BON, BAU), la disparition de l'antigène après plusieurs mois d'hépatite ictérique, a permis de prévoir la guérison de ces malades, avant la rétrocession de l'ictère.

L'Ag Au, dans les hépatites à évolution favorable et rapide, semble caractérisé par un titre assez faible, une dispersion des particules, représentées par les formes rondes et tubulaires, et apparemment une absence de formes en cocarde.

Dans les hépatites plus sévères, l'Ag Au est retrouvé avec un titre plus élevé sous les trois morphologies avec une hétérogénéité de répartition des particules, c'est-à-dire la présence de complexes Ag Au-Ac anti Au au début, puis une disparition progressive des complexes circulants et maintien de l'Ag Au dans le sang sous forme de particules isolées.

Entre ces deux extrêmes nous avons rencontré, en fonction de la gravité de l'hépatite et de son temps d'évolution, des complexes circulant pendant des temps plus ou moins longs et la présence de cocardes dans les formes sévères mais d'une manière inconstante et en pourcentage variable.

"L'état de l'Ag Au" dans le sang paraît être le reflet de la "réactivité immunologique" du sujet qui doit intervenir dans la gravité et le temps d'évolution d'une hépatite.

" PORTEURS SAINS " D'ANTIGENE AUSTRALIE

I - DONNEURS DE SANG

Au nombre de 6, ils ne présentent pas d'antécédents particuliers mais le sang de l'un d'entre eux a provoqué une hépatite chez le receveur.

Ils n'ont jamais eu d'ictère et les bilans hépatiques n'ont jamais été perturbés. Le titre de l'Ag Au en E.I.D. est resté faible et constant dans le temps et varie d'un sujet à l'autre de 1/1 à 1/8.

La microscopie électronique a montré une dispersion des particules et la présence de cocardes dans un cas : le donneur qui a transmis une hépatite (0,5 %). Les particules rondes et tubulaires sont présentes, avec prédominance de l'une ou l'autre forme suivant les sérums, la structure fine est masquée par une incrustation de lipoprotéine et une "gangue" qui rend souvent floues les structures

II - UNE MILIAIRE TUBERCULEUSE

M. DEM., 25 ans, de race noire, est entré le 28 Mars 1971 dans le service du Professeur Loeper avec une asthénie, douleurs thoraciques et image de miliaire pulmonaire.

La biopsie hépatique effectuée révèle des lésions tuberculeuses. Il est traité par Rimifon, Streptomycine et P.A.S. puis sous Rifamycine (600 mg/jour).

L'éosinophilie sanguine, en Mai 1971, est à 15 % . Un traitement au CORTANCYL a débuté le 19 Mai à raison de 30 mg/jour et jusqu'au 7 Juin.

La laparoscopie, le 17 Juin, montre un foie de stéatose avec début de fibrose. La biopsie hépatique du 17 Juin révèle des lésions tuberculeuses folliculaires péritonéales avec discrète stéatose hépatique sans sclérose véritable.

Les transaminases n'ont jamais été augmentées et l'Ag Au découvert à l'occasion de la recherche systématique, le 1er Mars, a persisté en titre constant de 1/10 en E.I.D. jusqu'au mois de Juin (dernier examen effectué).

La microscopie électronique **sur le sérum du 22 Avril 1971** montre une répartition homogène des particules représentées en majorité par des tubules très longs et flexueux (98 %) et quelques particules rondes avec absence apparente de cocardes. Quatre sérums ont pu être examinés entre le mois de Mars et le mois de Juin et l'aspect de l'Ag Au dans le sang est resté le même avec seulement une altération sensible de la morphologie des tubules dans les 2 derniers prélèvements.

Ces 7 observations de porteurs sains sont fragmentaires et il est difficile d'en tirer des conclusions.

La plupart des statistiques rapportent la rareté de la présence de particules en cocarde dans les sérums : 1 pour 257 sérums étudiés pour certains, 9 sur 46 pour Cossart (55). Jokelainen et coll. (114) montrent que les particules en cocarde se retrouvent pour 1/500 - 1/2500 des particules d'Ag (statistique portant sur 3 sérums).

Nous avons constaté que le titre de l'Ag Au est rarement très élevé (le plus fort titrait 1/16 en E.I.D.) et son aspect est à peu près constant dans le temps. Les particules en cocarde ont été retrouvées dans un cas sur 6.

Les altérations de la morphologie des particules semblent liées à la durée de circulation de l'Ag Au dans le sang. Lorsqu'il est présent dans la circulation depuis un certain temps on peut observer 2 types de particules : les unes à contour et morphologie nets et d'autres à structure altérée avec des zones renflées et "floues". Nous pensons que "l'empâtement" de ces particules serait dû au dépôt de lipides et de lipoprotéines à leur surface.

Ces remarques nous permettent de déduire que :

1 - l'altération de la morphologie des particules en fonction du temps, la présence et la persistance de ces formes sembleraient indiquer que les cellules du système réticulo-endothélial (S.R.E) - histiocytes macrophages- (cellules de Kuppfer et autres) ne peuvent pas phagocyter ces "déchets" soit parce que débordées par le nombre, soit, ce qui paraît le plus vraisemblable, parce qu'elles sont ou deviennent incapables de le faire. (L'organisme devient tolérant)

2 - en appréciant le pourcentage de formes altérées et de structures non altérées on peut avoir une idée sur la persistance de l'Ag Au et sa durée de circulation dans le sang.

3 - l'observation d'une variation de pourcentage permet de penser que lorsque les formes non altérées ne sont plus visibles, c'est-à-dire que leur multiplication s'est arrêtée, l'AgAu ne va pas tarder à disparaître de la circulation.

Inversement, lorsqu'un certain pourcentage de particules d'Ag reste parfaitement structuré dans le temps, cela semble indiquer que le lieu de synthèse est toujours actif et que l'Ag circulant va persister. (Planche 7). Il s'agit dans ce cas de "porteurs chroniques actifs".

HEPATITES AVEC ANTICORPS ANTI-AUSTRALIE

Nous avons suivi 5 cas qui sont rapportés succintement.

1er CAS

M. WEB, 20 ans, entre dans le service du Professeur Sarrazin pour une hépatite ictérique avec un Ac précipitant, trouvé au cours du dépistage systématique, titrant 1/3 en I.D. L'hépatite régresse rapidement et l'Ac se maintient avec un titre augmenté légèrement au 1/5. La microscopie électronique montre un vide optique parfait.

2ème CAS

M. ORP, 30 ans, de nationalité grecque, entre dans le service du Professeur Sarrazin pour une hépatite virale. Le dépistage systématique révèle la présence d'un Ac précipitant (1/8 en I.D). L'hépatite évolue favorablement en 6 semaines et le titre en Ac se maintient : 1/8;1/10 en E.I.D. La microscopie électronique effectuée sur le sérum a montré une absence totale de particules.

3ème CAS

M. BRO, 38 ans, service du Professeur Loeper, malade atteint d'un cancer de l'œsophage, fait une hépatite post-transfusionnelle qui évolue très rapidement et favorablement. La recherche de l'Ag Au a toujours été négative. Par contre, au début de son hépatite, un Ac de titre très élevé est mis en évidence : 1/32 en I.D. et 1/128 en E.I.D. La microscopie électronique révèle une absence de particules.

4ème CAS

M. PAU, 68 ans, entre dans le service du Professeur Loeper le 31 Août 1971 pour exploration d'un ictère apparu peu de temps auparavant (la mention de transfusion est retrouvée en Mai 1971) avec bilirubine à 570 mg/l ; SGOT et SGPT à 1000 U. La recherche de l'Ag Au, dès son entrée, est négative mais un Ac titrant 1/20 en E.I.D est trouvé. En Septembre a lieu une deuxième poussée ictérique et le malade présente un **tableau de cholostase intrahépatique** : Taux prothrombine : 38 % - SGOT : 1700 - SGPT : 670. Le malade est admis dans le service du Professeur Sarrazin le 25 Octobre 1971. La ponction hépatique objective une hépatite chronique.

5ème CAS

M. BOJ, 60 ans, acanthocytose, polytransfusé, service du Professeur Loeper, présente une cirrhose décompensée. 7 recherches de l'Ag Au et de l'Ac anti-Au ont été effectuées en Février et Mars 1971 et ont toutes été négatives. Le 3 Avril 1971 apparaît un ictère avec transaminases élevées et un Ac anti-Au est identifié dans le sang 15 jours après le début de l'ictère, avec un titre croissant :- $\leqslant$ 1/1 en E.I.D. le 15 Avril $\longrightarrow$ 1/1 $\longrightarrow$ 1/2 $\longrightarrow$ 1/3 le 18 Juin.

Dans ces 5 cas d'hépatites, toutes ictériques, l'Ag Au n'a jamais été identifié dans le sang des malades et lors de la première recherche, **au moment de l'ictère, un Ac a été découvert.** Pour 2 d'entre eux, ces recherches (Ag Au et Ac anti-Au) ont pu être effectuées et ont été négatives pendant la phase préictérique. L'Ac anti-Au est apparu au moment de l'ictère avec un titre croissant.

Ces constatations d' "hépatites avec Ac" viennent s'ajouter à celles faites par d'autres auteurs et apportent un argument en faveur de la conception suivante : lorsque l'Ag Au n'est pas libéré dans la circulation sanguine, il semble que la synthèse de l'Ac anti-Au ne soit pas inhibée et un Ac précipitant peut être mis en évidence dans le sang.

Ces sujets ont été contaminés par l'Ag Au et l'hépatolyse a lieu sans libération d'Ag Au dans le sang. Dans la majorité des hépatites, on ne retrouve pas d'Ac anti-Au. Tous les auteurs sont d'accord pour affirmer que, contrairement aux autres viroses, l'apparition d'un Ac anti-Au est exceptionnelle excepté chez les polytransfusés (les hémophiles). J.P. Soulier rapporte, sur 67 cas d'ictères graves un seul cas avec Ac. L'immunité anti-virale semble particulière puisque, à l'encontre des autres viroses où une réponse humorale avec anticorps est normalement observée, dans l'hépatite c'est l'antigène viral qui est mis en évidence dans le sang. L'apparition d'un Ac anti Au est une exception.

De nouvelles techniques de détection de l'Ac anti Au plus sensibles (dosage radio-immunologique, hémagglutination) semblent montrer que les porteurs d'anticorps sont plus nombreux mais le pourcentage de sujets ayant un anticorps n'est significativement pas plus élevé chez ceux qui viennent de faire une hépatite que chez les donneurs de sang.

Il existe cependant une faible réponse anticorps chez les sujets ayant une hépatite, puisque la microscopie électronique nous permet de constater des images de type complexes immuns. Mais cette réponse ne paraît pas proportionnée à la quantité d'antigène présente. L'excès d'antigène masque donc la réponse anticorps, tout l'anticorps anti Au présent dans le sérum étant déjà lié à l'Ag Au.

L'ANTIGÈNE AUSTRALIE

SA MORPHOLOGIE

ET SON ASPECT DANS LE SANG

Lorsque Bayer et Blumberg en 1968 décrivirent la présence de particules dans le sang de sujets ayant l'Ag Au qui semblaient représenter le support de cet antigène, un grand pas fut franchi dans la connaissance de cet Antigène particulier retrouvé avec une assez grande fréquence chez les sujets atteints d'hépatite d'inoculation. Parmi les hypothèses émises, celle de la nature virale de ces particules fut aussitôt faite, mais l'échec de la mise en évidence d'un acide nucléïque d'une part et de la culture de ce virus éventuel d'autre part freinait cette hypothèse. En 1969, Almeida et Waterson décrivaient la présence de complexes immuns dans le sang de sujets atteints d'hépatite, constitués par des particules d'Ag Au liées entre elles par un anticorps anti Au.

Dane, en 1970, montrait à côté des particules déjà décrites de l'Ag Au la présence de particules plus grandes de 40 nm environ ressemblant à un virus et émettait l'hypothèse que cette forme représentait le virus de l'hépatite ; les formes rondes et allongées étant du matériel protéique viral en excès.

L'état des connaissances était à ce niveau lorsque nous avons commencé nos travaux.

L'examen minutieux de près de 100 sérums ou plasma Ag Au + d'origines très variées a été réalisé. La mise au point d'une technique d'observation en microscopie électronique qui altère le moins possible l'aspect de l'Ag Au, les essais de résistance à différents traitements, l'emploi d'Ac anti Au nous permettent d'avoir une certaine conception du "complexe Ag Au circulant ".

1/ **Examen des grilles en microscopie électronique.**

L'observation en microscopie électronique des culots de centrifugation d'un sérum, "coloré" et déposé sur les grilles, montre, lorsque le sérum est "propre" c'est-à-dire prélevé d'une manière stérile et conservé à - 20°, des champs microscopiques optiquement vides.

Si la première centrifugation à 2.500 T.P.M. dans le rotor Sw 50 n'a pas été effectuée, les champs microscopiques peuvent révéler la présence de certains débris cellulaires et dans certains cas d'un feutrage plus ou moins serré de lipoprotéines.

De la même manière un sérum mal conservé ou prélevé de manière non stérile donne des champs microscopiques avec de nombreux débris et autres déchets, flagelles de bactéries, mycoplasme etc... qui "fixent le colorant" : on dit que le sérum n'est pas "propre"; la conséquence directe est la mauvaise "coloration" des particules d'Ag Au présentes et quelquefois leur altération. D'où la nécessité de prélever le sang de manière rigoureusement stérile, de conserver le sérum à - 20° ou mieux à - 80°. Dans ces conditions, les champs microscopiques sont en général optiquement vides et les particules d'Ag Au se détachent nettement et sont les seules visibles avec une morphologie parfaitement conservée.

2/ **Les particules présentes dans les sangs Ag Au +**

L'examen des grilles à un grossissement courant de 50 à 80.000 permet de voir plusieurs types de particules dont la structure est plus ou moins visible et qui, dans de nombreux sérums, semble masquée par une sorte de gangue cotonneuse ou un feutrage très fin qui rend l'étude des détails de structure difficile. Quatre sortes de particules sont en général identifiées dans les sangs Ag Au + : les plus fréquentes sont les formes arrondies ou sphériques ou "bille" de 20 nm en moyenne et les formes allongées ou tubulaires ou bâtonnets ; plus rares, des formes rondes plus grandes de 40 nm appelées : particules de Dane, ou en cocarde à cause de leur aspect ; enfin beaucoup plus rares des aspects intermédiaires entre les trois types précédents que nous avons rassemblés dans un quatrième groupe et qui ont l'aspect de "raquettes" "d'haltères", de "massue", de "téléphone", de "tétard" etc...

a) **Les formes sphériques**

Leur aspect est différent suivant les sérums et on peut distinguer cinq morphologies :

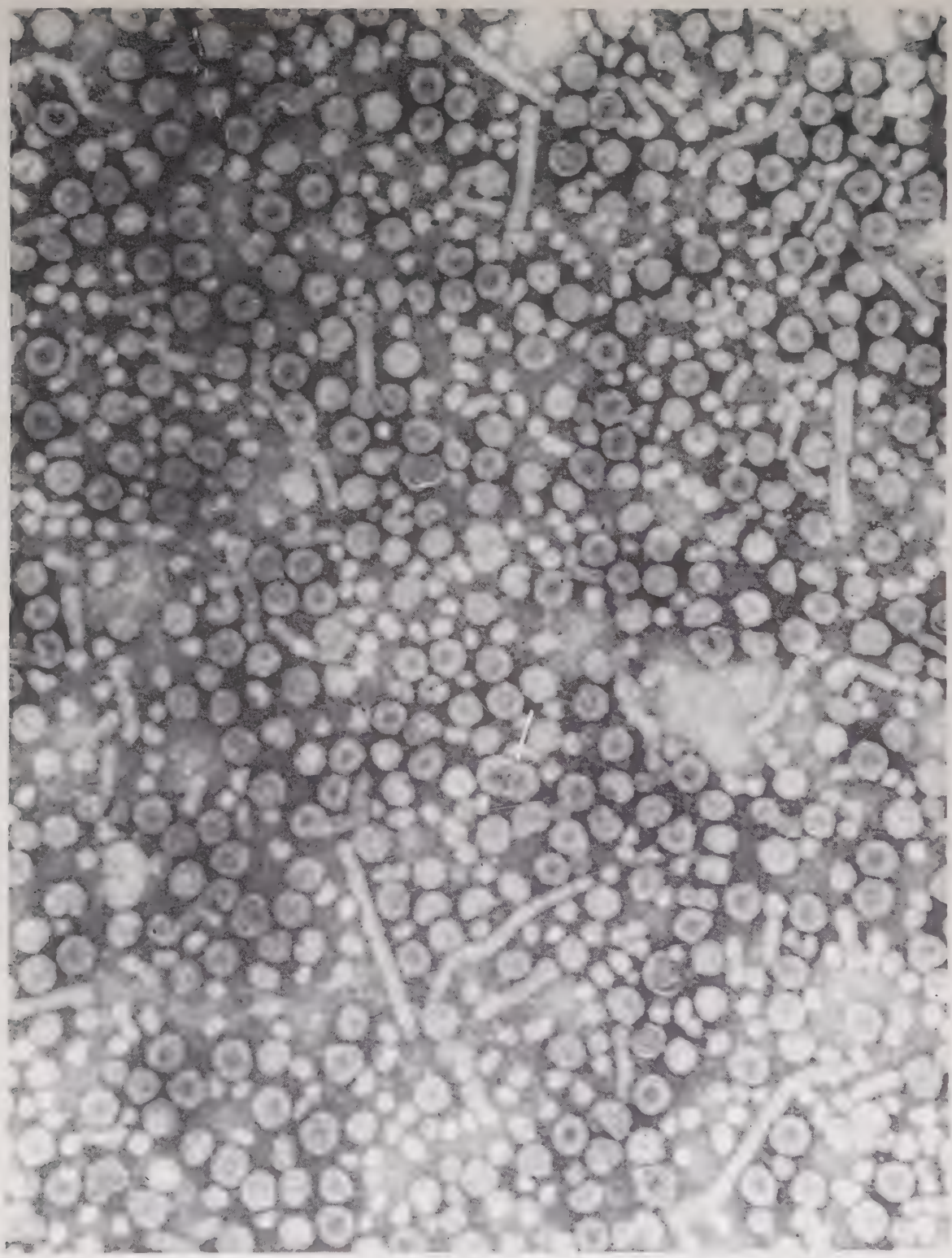


Planche 19 Grossissement : x 144.000
Les différentes formes structurales sous lesquelles l'ANTIGENE AUSTRALIE est synthétisé et libéré dans la circulation sanguine. Cocardes, tubules, particules sphériques, et formes intermédiaires entre ces dernières : en raquette, en haltère, en double cocarde, (—>) etc..

- ou bien parfaitement rond et "plein" avec une fine granulation pouvant correspondre à des sous unités structurales de 30 A°environ.

- ou bien parfaitement rond mais avec un centre clair, cet aspect est mieux souligné par la "coloration" au molybdate d'NH4 (planche 6a)

- ou bien à structure plus floue et contour peu net, cotonneux, assez difforme, ovale et boursoufflée trouvées lorsque l'Ag Au circule depuis quelques mois dans le sang chez les porteurs chroniques (planches 7 et 14)

- ou bien d'aspect centré mais avec un centre plein apparent. Ces structures sont visibles en petit nombre dans beaucoup de sérums, en quantité limitée.

- ou bien d'aspect étoilé lorsqu'elles sont réparties d'une manière hétérogène sur les grilles, en complexes.

Leurs dimensions varient de 16 à 27 nm avec une moyenne de 20 nm.

De l'examen de toutes ces structures, il ressort que cette particule est certainement **sphérique** et constituée par un arrangement de sous unités autour d'un centre qui est vide (ou plein pour quelques particules mais distinct et visible). Ces particules ont une structure avec "sous-unité" visible lorsqu'elles viennent d'être libérées dans le sang. Le réarrangement des "sous-unités" est plus ou moins compact laissant voir dans certains cas un centre clair.

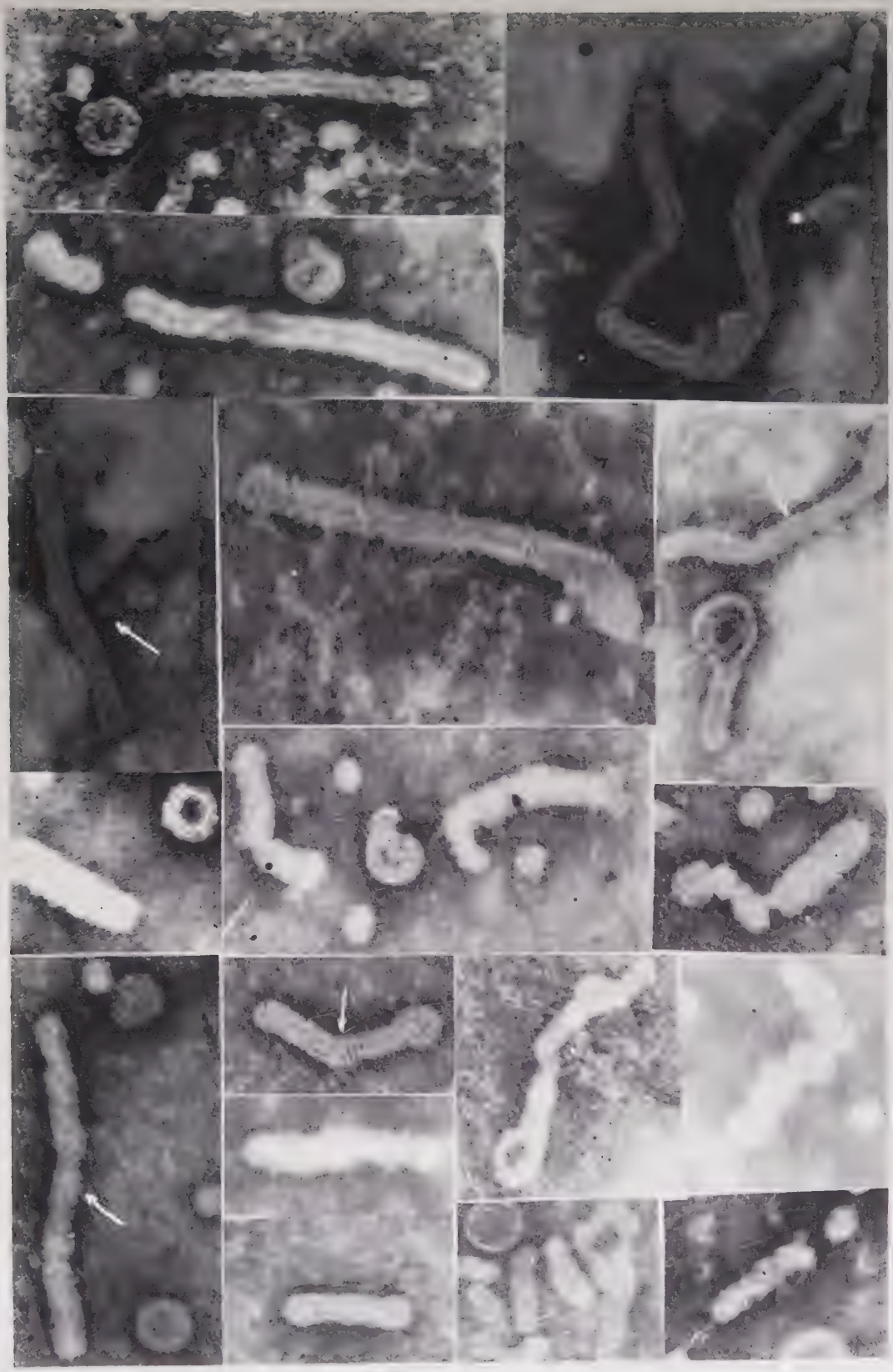
Chez les porteurs chroniques (dont le système réticulo-endothélial semble ne pas phagocyter tous les "déchets") ces particules prennent un aspect cotonneux. La structure fine est masquée et même entièrement remaniée ; il semble y avoir une incrustation et une gangue qui vient empâter toute la structure (peut être des phospholipides et lipoprotéïnes (planches 7, 14,)

b) **Les formes tubulaires**

L'Ag Au se présente aussi sous l'aspect de particules allongées ; Bird n'identifie un Ag Au dans le sang en microscopie électronique que sur leur seule présence. Elles sont plus caractéristiques pour un œil averti que les formes sphériques qui sont difficiles à identifier lorsqu'elles sont peu nombreuses et à structure "floue". (planche 20)

Les principaux aspects sont les suivants :

- en "bâtonnet" compact avec des sous-unités visibles ; le diamètre est le même tout le long de la particule c'est-à-dire de 20 nm en moyenne ; leur longueur varie de 40 à 600 nm ; on peut distinguer une striation transversale pour certains.
- en "châpelet" donnant l'aspect d'une succession de particules sphériques accolées les unes aux autres ou de renflements successifs tout le long de la particule, particulièrement visibles chez certains dialysés (avec coloration au Molybdate (Planche 6)
- en tubule, assez fréquent, rencontré dans certains sérums en majorité ; quelques aspects tubulaires sont visibles dans presque tous les sérums.
  Leur morphologie laisse voir une lumière centrale avec quelquefois une structure centrale supplémentaire.
- enfin, des particules assez difformes de diamètre variable, irrégulier (jusqu'à 35 nm) renflées, boursoufflées à surface cotonneuse et contour peu net ; rencontrées dans dans les sangs de porteurs chroniques (dialysés) et hépatite chronique au bout d'un certain temps de présence. Ces particules semblent être en voie de dégradation et quelquefois on a l'impression d'une gangue cotonneuse incrustant et marquant la structure composée, peut-être comme pour les particules sphériques, de phospholipides et de lipoprotéines.



Plahcne 20 Grossissement : x 240.000
Différents aspects sous lesquels les formes allongées de l'ANTIGENE AUSTRALIE peuvent être observées dans le sang : en bâtonnet, en tubule ; de diamètre variable et de structure fine différente suivant les particules. La particule qui vient d'être libérée dans le sang a une structure tubulaire régulière (—➤) et suivant la durée de persistance dans le sang on peut voir les aspects rassemblés ici.

Ces différents aspects présentés par les formes allongées de l'Ag Au semblent correspondre à une unité structurale de base d'aspect tubulaire dont la paroi serait constituée par des sous-unités de 30 A° dont la dimension est égale aux sous-unités des particules sphériques (28 à 30 A°). Suivant le réarrangement des sous-unités, la lumière centrale sera visible ou non et les particules auront un aspect en "bâtonnet" ou en tubule, ou bien "en chapelet".

Ces aspects structuraux seront masqués dans certains sangs de porteurs chroniques par une gangue cotonneuse ou bien par une incrustation de molécules dans la paroi des tubules.

c) **Les particules "en cocarde".**

Appelées au début particules de Dane, Dane ayant été le premier à montrer leur existence. Elles sont caractéristiques par leur aspect assez constant dans tous les sérums et chez les porteurs chroniques avec une partie externe en double couronne entourant un centre plein ou vide suivant les particules évoquant une cocarde.

Les différents aspects sont les suivants :

- en double couronne entourant un centre plein qui a lui-même une structure centrée dans plusieurs particules. Chaque couronne interne et externe paraît constituée de sous-unités de 30 A°.
- en double anneau - extérieur ayant l'aspect d'une enveloppe, c'est-à-dire astructuré
  - intérieur en couronne avec sous-unités de 30 A°.

  Les deux anneaux ne sont pas toujours distincts et parfois fondus en un seul.
- avec une structure pleine dont la surface paraît constituée de sous-unités de 30 A°.

Pour de nombreuses cocardes, on retrouve un aspect icosaédrique, pentagonal ou hexagonal.

Leur dimension moyenne se situe aux environs de 40-41 nm. La fixité de ces structures retrouvées intactes dans un sang avec un Ag Au en voie de disparition chez un porteur chronique est assez remarquable.

Ces différents aspects semblent correspondre dans l'espace à une seule et même structure : deux "sphères" constituées de sous-unités imbriquées l'une dans l'autre entourant une partie centrale qui est pleine ou vide. Les sous-unités de la couronne externe sont souvent masquées dans de nombreux sérums (dialysés) par un anticorps ou une gangue de nature vraisemblablement phospholipidique et lipoprotéique d'épaisseur variable qui vient s'inscruter et donner l'aspect d'une enveloppe (peplum).

d) **Autres formes prises par l'Ag Au.** (planche 23)

- formes en raquette, haltère, têtard, téléphone,

constituées par une partie externe à structure plus ou moins visible permettant de deviner des sous-unités de 30 A°; renflées à une extrémité ou aux deux avec une structure interne en couronne avec sous-unités de 30 A°. Ces images donnent l'impression de cocardes "emmanchées" d'un tubule et laissent supposer que la couronne externe des cocardes correspond à la "paroi" des tubules et donc à la "paroi" des particules sphériques.

- autres formes, très rares et représentées dans les planches 15 b et 20, deux couronnes côte à côte entourées par une troisième couronne.

. Le sang du KAPOSI montre des images tout à fait particulières avec un grand pléomorphisme des particules tubulaires et sphériques dont les structures respectives, bien individualisées, ont disparu.

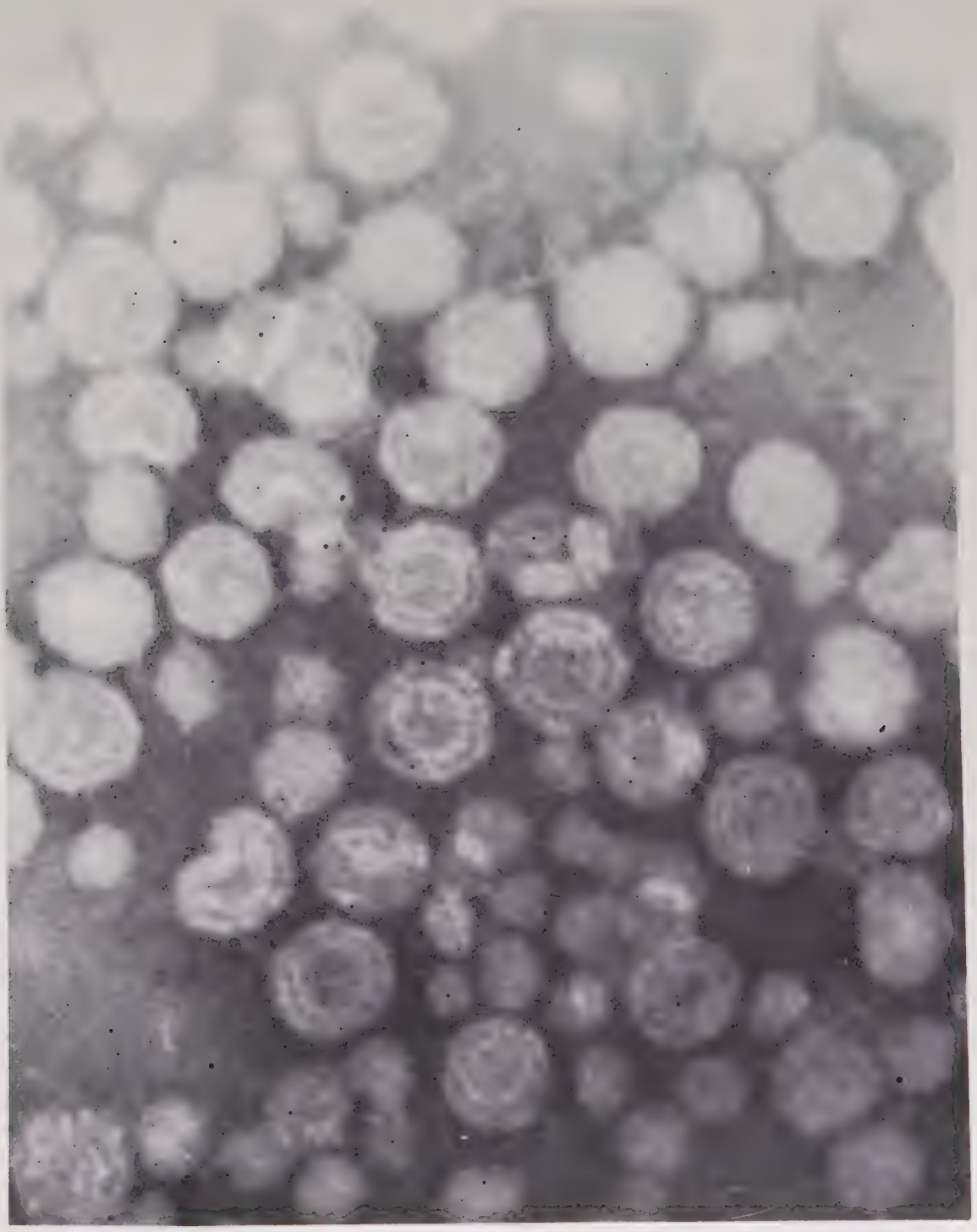


Planche 21 Grossissement : x 240.000
Les particules de Dane ou bien dite en COCARDE se présentent sous forme "pleine" avec des sous-unités visibles à leur surface, et sous l'aspect d'une double couronne entourant un centre qui est plein ou vide. La structure géométrique est ici très caractéristique. La transposition de la structure dans l'espace permet de penser que chaque particule est constituée de 2 capsides icosaédriques concentriques entourant un nucléoide d'acide nucléique ; l'ensemble correspondrait au virus B complet et infectant.

3/ Relation entre ces différentes structures

Il existe une certaine unité tant sur le plan antigénique que structural.

a) Unité antigénique

L'Ag Au représente une entité antigénique et les techniques immunologiques ne permettent pas de différencier les Ag Au entre eux sur le plan des spécificités et des déterminants antigéniques. Il faut remarquer que Le Bouvier(131)par la méthode d'Ouchterlony a mis en évidence des éperons permettant de différencier deux Ag Au mais on ne connait pas aujourd'hui leur signification exacte.

La microscopie électronique a permis comme nous l'avons vu, de révéler l'hétérogénéité des particules présentes qui semblent toutes être le support de l'antigénicité Australie.

Nous avons trois séries d'arguments pour montrer cette unité.

1 - deux sérums Ag Au + contenant respectivement l'un des particules en cocarde seules présentes et l'autre 95 % de formes sphériques,croisés en immunodiffusion contre un sérum anticorps anti Au, donnent une ligne en identité parfaite (M. RAM); de même, un sérum contenant uniquement des tubules donne une ligne de précipitation en identité parfaite avec les deux sérums précédents.

2 - nous avons pu observer l'existence d'agrégats de particules spontanés dans différents sérums. La présence d'agrégats mixtes, constitués de deux ou trois types de particules semble indiquer un lieu commun entre les trois particules sphériques, tubulaires et cocardes. Un anticorps assurant la liaison paraît être l'hypothèse la plus probable.
L'agrégation des particules par un anticorps anti Au est la démonstration que l'antigénicité Australie est bien supportée par les particules d'Ag Au. Les images de complexes sont à peu près identiques à celles observées spontanément in vivo. Avec des quantités croissantes d'anticorps, les aspects sont différents.
- avec 0,1 ml de sérum anticorps, les particules sont "accolées" les unes aux autres formant un tapis et représentant en fait un véritable réseau.
- avec 0,9 ml,l'hétérogénéité de répartition est complète montrant de volumineux complexes.
- avec des quantités intermédiaires entre 0,1 et 0,9 ml de sérum anticorps on voit apparaître une hétérogénéité qui se manifeste sous forme de "trous" dans le tapis.

b) Unité structurale

L'observation de formes particulaires ayant une structure intermédiaire entre cocardes, tubules et particules sphériques permet d'apporter des arguments dans le sens d'une certaine unité structurale.

Leur examen minutieux montre que la couronne la plus externe des cocardes est identique à la paroi des tubules et des particules sphériques. Les images de bâtonnets en "chapelet" et de certains bâtonnets avec renflements et étranglements successifs vont dans le sens d'une structure commune entre particules sphériques, tubulaire et couronne externe des cocardes.

4/ Répartition des particules dans le sang.

A côté des différents aspects particulaires de l'Ag Au, on observe de grandes variations suivant les sujets et la phase de l'hépatite considérée dans la répartition des différentes formes de l'Ag Au. Nous employons le terme de "complexe Antigène-Australie" (qu'il ne faut pas confondre avec les complexes au sens immunologique du terme des particules d'Ag Au avec l'anticorps anti Au) pour définir les aspects variés présentés par l'Ag Au dans le sang et que révèle la microscopie électronique.

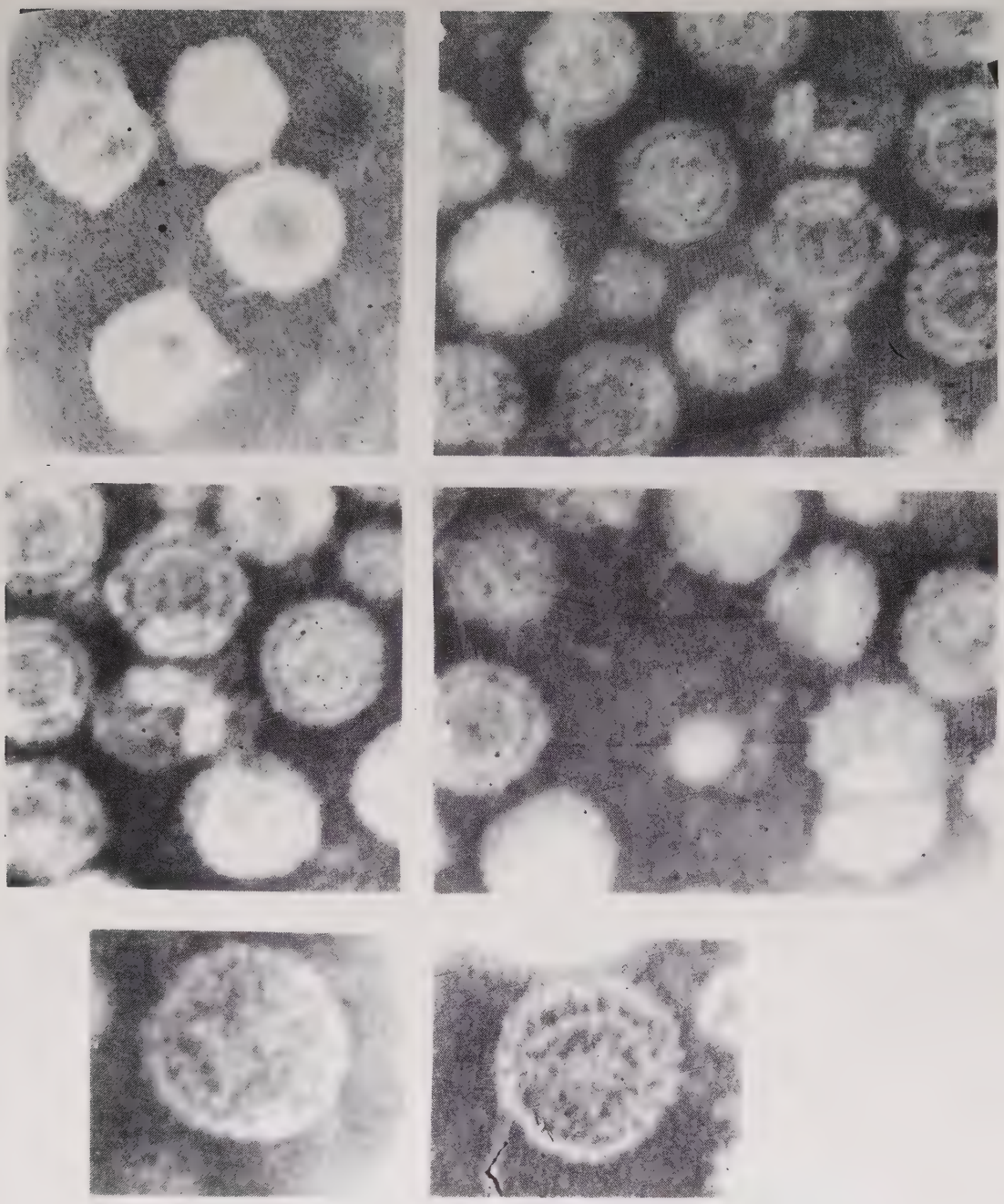


Planche 22 Particules en COCARDE de 38 à 40 nanometres
Différents aspects dans le sang en coloration négative.
En haut et à gauche : Coloration au molybdate à 2 %
Grossissement : x 480.000
M. RAM : L.A.M. 2 mois avant une hépatite avec Ag Au.

En haut à droite et au milieu :
Grossissement : x 480.000
M. MIX, Hépatite chronique
Coloration au P.T.A. à 3 %
Grossissement : x 700.000
M. MON L.L.C
Coloration au P.T.A. à 3 %

Les sous-unités parfaitement visibles mesurent 28 à 30 A° et évoquent des capsomères.

Nous voulons rappeler ici que les conditions opératoires et de réalisation technique demandent une grande rigueur pour leur exécution et ce n'est que dans une standardisation totale de traitement de tous les sérums avant leur examen au microscope électronique que l'on pourra faire une étude comparative. Un même sérum Ag Au + observé plusieurs fois doit donner toujours le même aspect en microscopie électronique ; les agrégats et la répartition hétérogène sur les grilles ne sont pas des artéfacts de centrifugation ou de coloration dans les conditions techniques employées.

Deux aspects principaux sont rencontrés :

a - L'Ag Au se présente sur les grilles sous forme de particules dispersées, plus ou moins bien régulièrement réparties sur la grille. Nous parlons dans ce cas de répartition homogène. (Planches 2 - 6 - 14 - 15 - 17 b -19)

b - L'Ag Au montre une répartition hétérogène : les particules sont rassemblées en amas, soit en totalité, soit en partie et on peut définir un pourcentage de particules agrégées par rapport aux particules non agrégées, c'est-à-dire dispersées.

Les dimensions et la composition de ces agrégats sont variables :

. Les plus petits (de 2 à 10 éléments) représentent ce que nous appelons les microcomplexes, constitués d'un type de particules en cocarde (M. POI) ou des trois types, c'est-à-dire mixte.

. Des agrégats intermédiaires de 10 à 50 éléments correspondent à des complexes avec un ou plusieurs types particulaires
- sphériques (M. GAR)
- mixte (M. DAH), cocardes (M. POI).

. Des agrégats volumineux de 100 à 1000 particules et même plus, en général composées par 98 % de cocardes (M. ROC) ; ils représentent ce que nous appelons des macrocomplexes. Leur dimension peut atteindre 1,5 à 2 µ de diamètre, ce qui est assez considérable !

Nous nous sommes demandés quelle était la signification de ces amas de particules. Almeida et Waterson, (6) les premiers qui ont observé ces faits dans les sangs Ag Au +, ont pensé que cela représentait de véritables complexes immuns ; les particules sont liées entre elles par un anticorps anti Au et fixent le complément.

De nombreux arguments vont dans ce sens :

- La stabilité de ces agrégats.

- Leur aspect assez caractéristique : dans certains cas, des ponts filamenteux reliant les différents éléments entre eux font penser à des ponts d'Immunoglobulines (IgG probablement) (Planches 1 - 3 - 17 a - 17 c - 25 - 26 - 29).
- Les agrégats artificiels obtenus par addition d'un anticorps anti Au (mais sans ajouter de complément) ont un aspect sensiblement identique.
- Les sérums contenant des complexes en début de formation sont fréquemment anticomplémentaires et il semble logique de penser que le complément a été activé par des complexes Ag Au - Ac anti Au.

Nous n'avons pas pu effectuer le dosage du complément systématiquement, en travaillant sur des sérums frais (venant d'être prélevés) et d'autre part la démonstration effective d'anticorps anti Au à la surface des particules et des agrégats n'a pas été faite, mais l'hypothèse la plus vraisemblable paraît être celle de **complexes immuns**.

Nous avons rencontré deux états différents, le plus fréquemment des complexes en excès d'Ag Au. L'excès de particules libres est apprécié en estimant le pourcentage de particules agrégées.

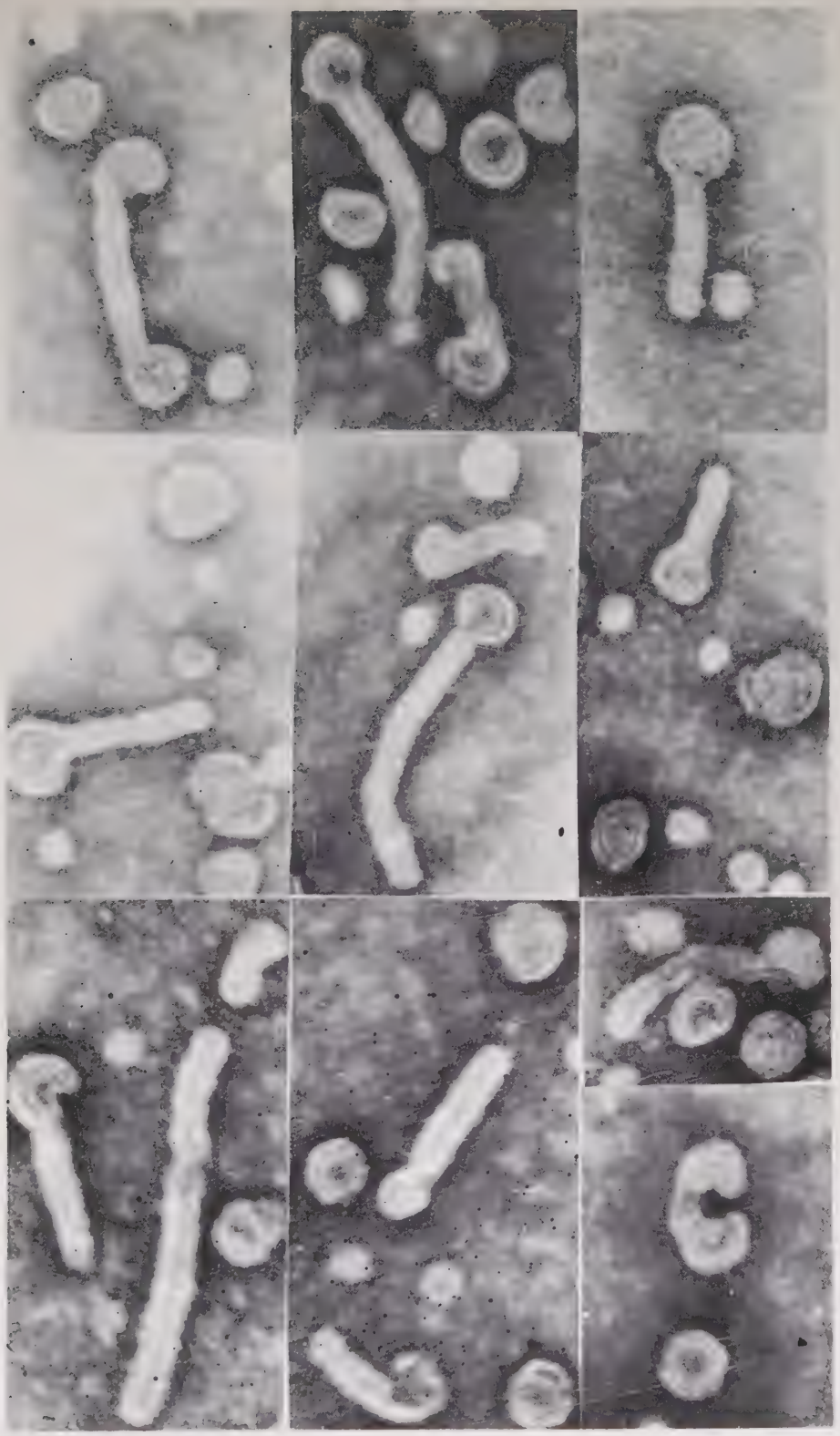
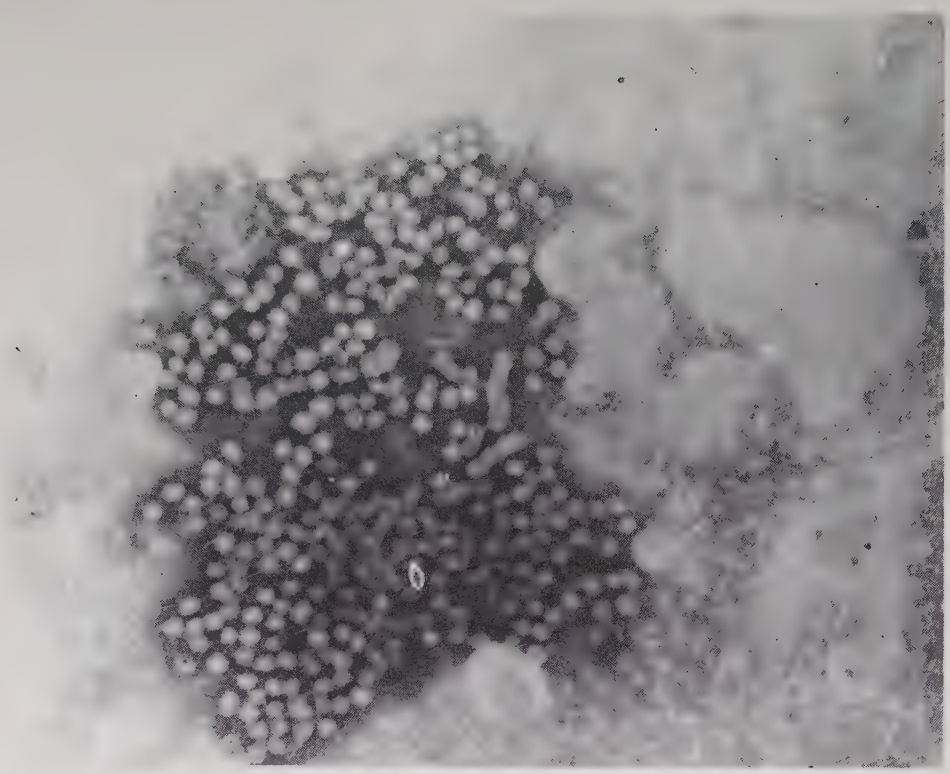


Planche 23 Autres formes de l'Antigène Australie. Très rares ; en Raquette, Tétard, Massue, etc. . .
Grossissement : x 240.000
Ces images permettent de voir la relation structurale existant entre les trois types principaux de l'Ag Au.
On peut les considérer comme des formes anarchiques de multiplication virale.



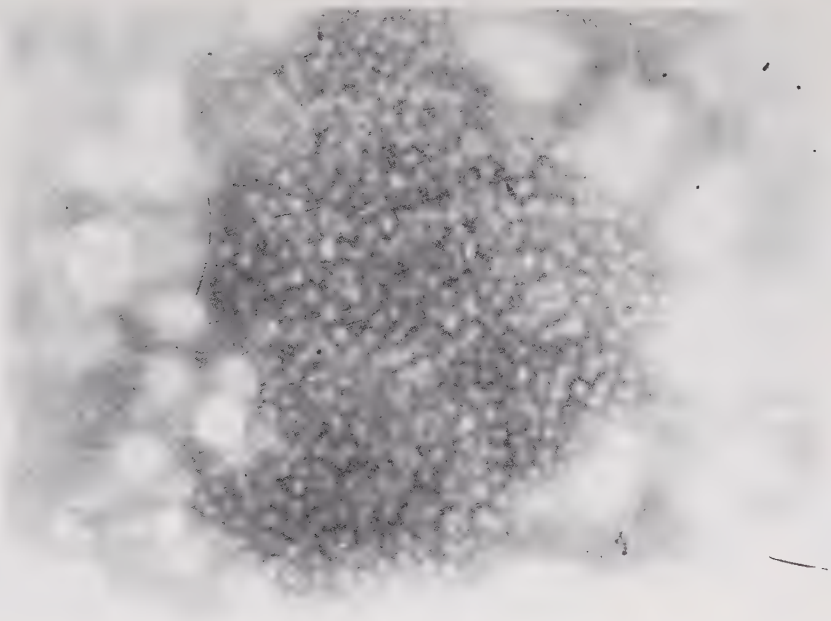


Planche 24 COMPLEXES ANTIGENE ANTICORPS

en haut : Un complexe circulant "naturel"
Grossissement : x 144.000
Mis en évidence dans le sang d'un sujet ayant une hépatite chronique ; constitué de particules rondes en majorité, toutes dans un même plan, avec un aspect en étoile et reliées entre elles par un fin feutrage représentant des molécules d'immunoglobulines selon toute vraisemblance (anticorps anti Au).

en bas : Un complexe artificiel provoqué par l'addition d'un sérum anticorps anti Au, sans ajouter de complément, à un sérum contenant des particules d'Ag Au dispersées. L'excès d'anticorps vient masquer les structures ; mais on distingue encore les cocardes.
Grossissement : x 96.000

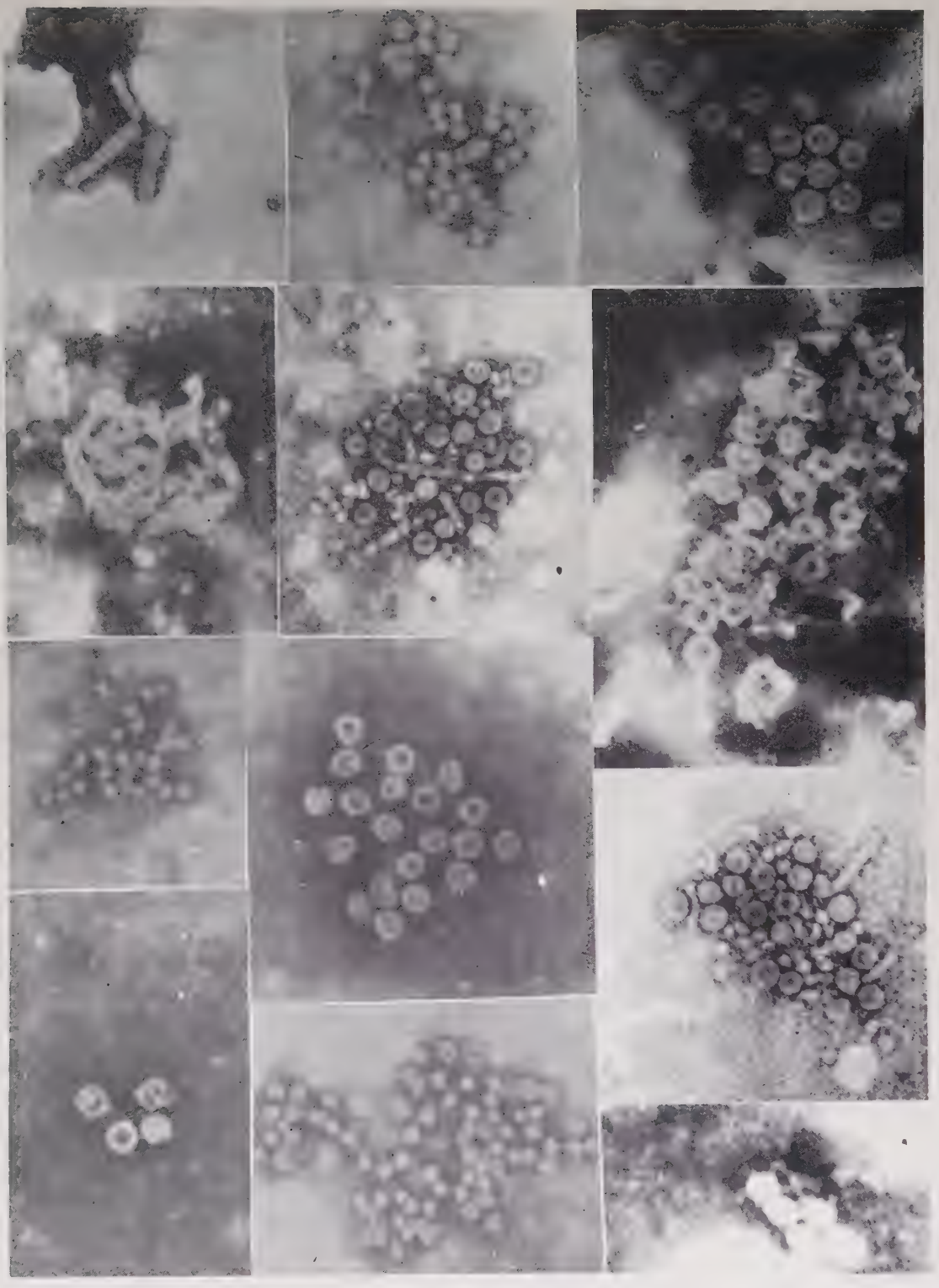
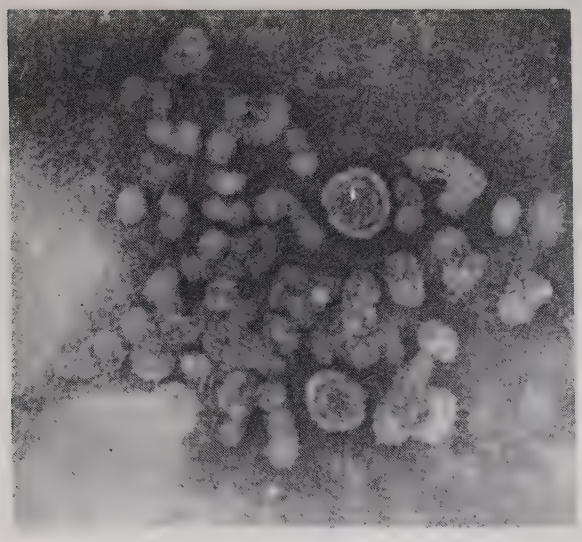


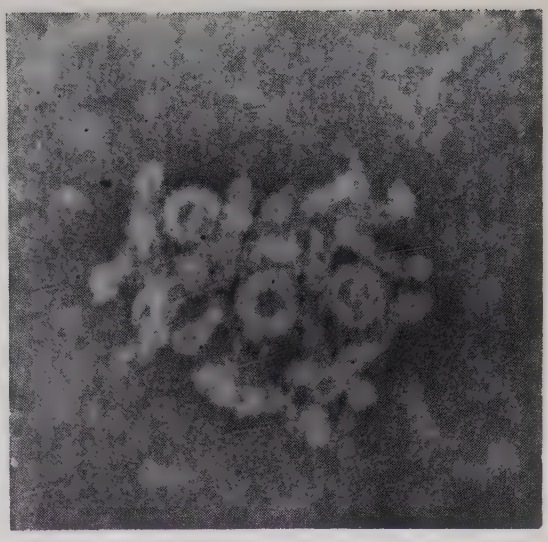
Planche 25 Agrégats de particules d'Ag Au représentant des COMPLEXES et MICRO-COMPLEXES IMMUNS.

1	2	3
4	5	6
7	8	9
10	11	12

Différents aspects rencontrés au cours de nos observations
Grossissement : x 144.000 sauf pour 5 et 9 : x 96.000
On peut remarquer les complexes monoparticulaires : de tubules
de cocardes
de particules rondes
et les complexes mixtes : avec 2 ou 3 types.

Les jonctions par des ponts d'immunoglobulines sont particulièrement visibles en 1, 3, 7, 10, 11.





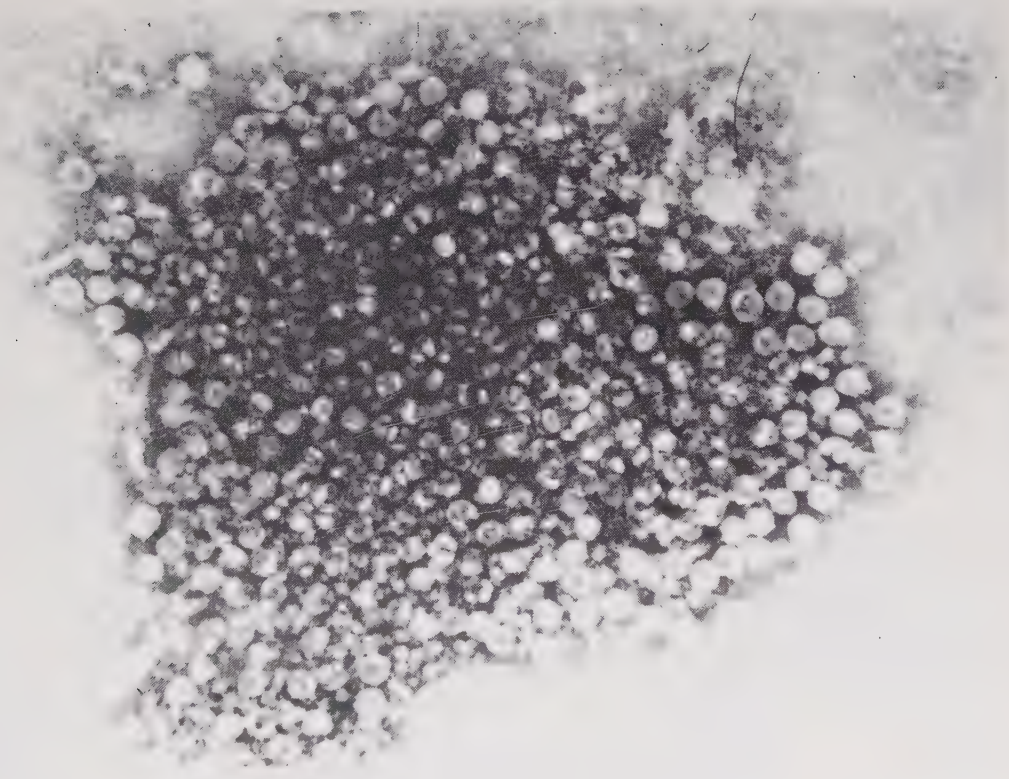


Planche 26 COMPLEXES ET MACRO COMPLEXES D'Ag Au

En haut : agrégats mixtes, grossissement : 240.000
à gauche : sang de maladie de KAPOSI
à droite : sang de Périartérite noueuse.

En bas : agrégat de plus de 500 cocardes, grossissement : x 96.000
sang d'hépatite post-transfusionnelle
mesurant 1,35 microns de diamètre environ c'est-à-dire à peu près le 1/5 d'une hématie.

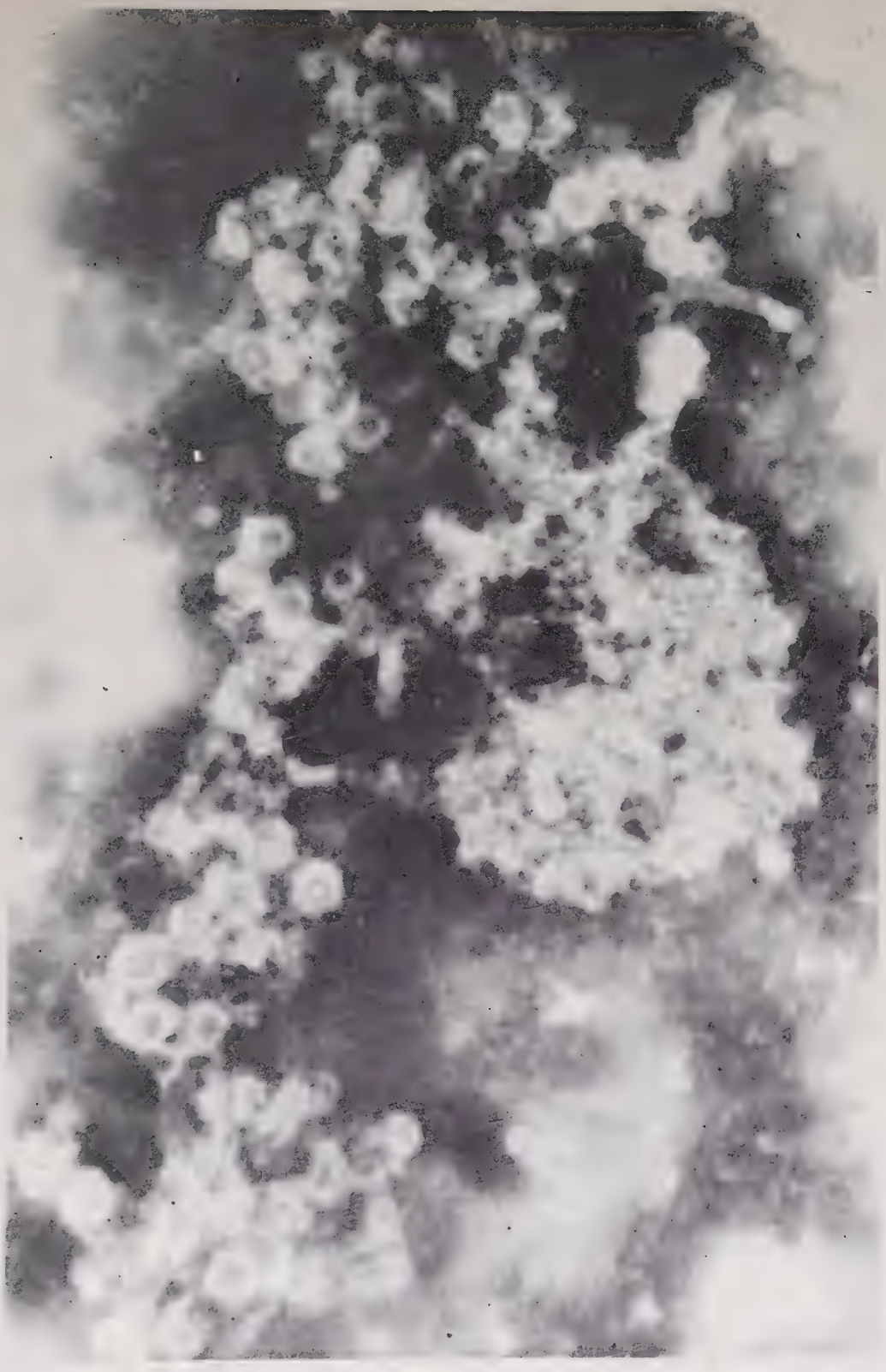


Planche 27 MACRO COMPLEXE D'Ag Au
Grossissement : 1 x 240.000

Un des aspects sous lesquels on peut observer les gros agrégats circulants dans le sang de M. POI. (PERIARTERITE NOUEUSE). Celui-ci mesure 1,1 micron de long, certains atteignent 2 microns c'est-à-dire environ le 1/4 d'une hématie.

Plus rarement, **des complexes équilibrés** ou en léger **excès d'anticorps anti Au** ; lorsqu'il n'y a pas de particules d'Ag Au libres, 100 % des particules étant en agrégats. Les images de complexes équilibrés ont été retrouvées :

. au début d'une hépatite chronique (M. GAR)

. pendant la phase préictérique d'une hépatite (M. RAM)

. pendant la durée d'évolution du KAPOSI (M. DAH).

Stabilité de ces complexes

La détermination en E.I.D. du titre de l'Ag Au en faisant varier le voltage permet d'apprécier la stabilité des complexes éventuellement présents.

Lorsque l'augmentation du voltage de 7 à 15 volts/cm ne se traduit pas par l'augmentation d'une ou deux dilutions au moins du titre d'un sérum Ag Au avec complexes, cela paraît être la preuve de la stabilité des complexes présents.

Il en est ainsi pour tous les complexes en équilibre, en excès d'Ac, ou en léger excès d'Ag Au.

5/ **Conception virale de l'Ag Au.**

Forte et Coll. (77') ont montré, en microscopie électronique après coloration négative, l'aspect présenté par les molécules des lipoprotéines ; la dimension des particules observées varie de 17 à 26 nm. La nature partiellement lipidique de l'Ag Au est admise, un simple examen minutieux des particules sphériques et tubulaires de l'Ag Au permet de voir que l'organisation et la structure particulière de ces formes excluent une origine moléculaire simple.

L'individualité et le degré d'organisation pris par certaines particules d'Ag Au (indépendamment de toutes autres considérations, pouvoir infectieux, etc.) donnent à penser qu'elles sont de nature virale.

Des quatre types de particules constituant l'Ag Au, la forme en cocarde paraît être celle qui puisse correspondre au virus B.

Les arguments qui vont dans ce sens sont nombreux :

– Les particules tubulaires et sphériques, par leur variabilité de forme et de dimension dans un même sérum, leur désagrégation et gonflement dans le temps, ne semblent pas pouvoir correspondre au virus complet.

– A l'inverse, les cocardes sont caractérisées par une assez grande constance dans leur forme et dimension et une résistance à la désagrégation beaucoup plus grande, ce qui est en faveur d'une particule virale parfaitement structurée donc résistante comme le sont de nombreux virus.

– L'argument principal reste celui de la morphologie par analogie avec des virus connus. Par exemple, les premières études comparatives, que nous avions faites entre les colorations négatives des polio-virus (270 Aº) et des cocardes complexées par un anticorps (M. RAM) ou bien des dialysés, semblaient montrer que ces dernières pouvaient correspondre à des virus polio avec une enveloppe supplémentaire. L'aspect d'enveloppe (ou peplum) rencontré dans de nombreux cas pour la couronne la plus externe de la cocarde ne correspond pas à sa structure réelle. Des études que nous avons entreprises, en traitant des sérums Ag Au + par l'éther dans des conditions variables montrent la disparition des bâtonnets et des particules rondes ayant une forme irrégulière (dialysés). Les cocardes restent intactes et révèlent parfois les sous-unités de la capside externe. Les sphères et bâtonnets dans certains Ag Au semblent peu touchés par un traitement modéré à l'éther. Cette expérimentation est encore insuffisante mais donne des arguments supplémentaires à l'hypothèse émise par Cossart (54). L'examen comparatif de très nombreuses particules nous permet donc de penser que les lipides ne font pas partie intégrante de la structure de

Planche 28 M. DAH. Maladie de Kaposi
Grossissement : x 480.000
Autre aspect d'un complexe Ag Au-Ac

La capside externe d'une des particules en cocarde s'est ouverte.
On peut reparquer sur certaines formes tubulaires comme des aiguilles piquees à leur urface et devant correspondre à des molécules d'immunoglobulines Ac.

l'antigène Au. D'origine plasmatique ils viendraient se surajouter et s'incruster entre les capsomères formant une véritable gangue et dans certains cas bouleversant entièrement la structure, ce qui aboutit à leur désagrégation.

Ces constatations montrent bien que l'Ag Au n'est pas quelquechose de simple tant au point de vue structural et morphologique que composition chimique. On doit définir la **qualité d'un Ag Au** d'après l'observation en microscopie électronique. L'Ag Au qui vient d'être libéré dans le sang a une structure et un aspect bien défini qui n'est plus le même au bout d'un temps de circulation et de persistance dans le sang.

Conception virale actuelle de l'Antigène Australie.

Le virus B complet et infectant semble pouvoir être identifié avec la forme en cocarde. De structure icosaédrique avec deux capsides imbriquées l'une dans l'autre composées chacune de capsomères de 30 A^{o}. Ces deux capsides entourent une partie centrale correspondant à un nucléoïde d'acide nucléique (114) peut être un ARN bicaténaire. La forme des capsides est souvent d'aspect géométrique, pentagonale ou hexagonale suivant les particules ; et on peut compter, par arête, 4 capsomères ce qui permet d'envisager pour la capside interne 92 capsomères. Le virus B aurait donc la structure d'un Réovirus.

- Les particules sphériques et tubulaires correspondraient à des réarrangements de capsomères bien particuliers :

soit de manière cubique en une seule capside, ce qui donne les particules sphériques de 15 à 20 nm.

soit de manière hélicoidale, donnant les particules tubulaires de 15 à 20 nm de diamètre sur 40 à quelques centaines de long.

Il a été montré pour les virus des plantes que la forme prise par les particules virales dépendraient des conditions du milieu au moment du réarrangement des capsomères (4). On peut donc penser que, suivant les cellules où à lieu la multiplication virale, les virions auront la forme complète de réovirus, et les formes incomplètes sphériques et tubulaires constituées, pour la grande majorité, de la coque protéique virale sans acide nucléique. Le pouvoir infectant respectif de ces trois types de virions reste à démontrer. A côté de ces trois formes principales existent quelques structures intermédiaires par suite d'un double réarrangement partiel des capsomères (formes en raquette, tétard, etc) ou bien un réarrangement totalement anarchique (M. DAH).

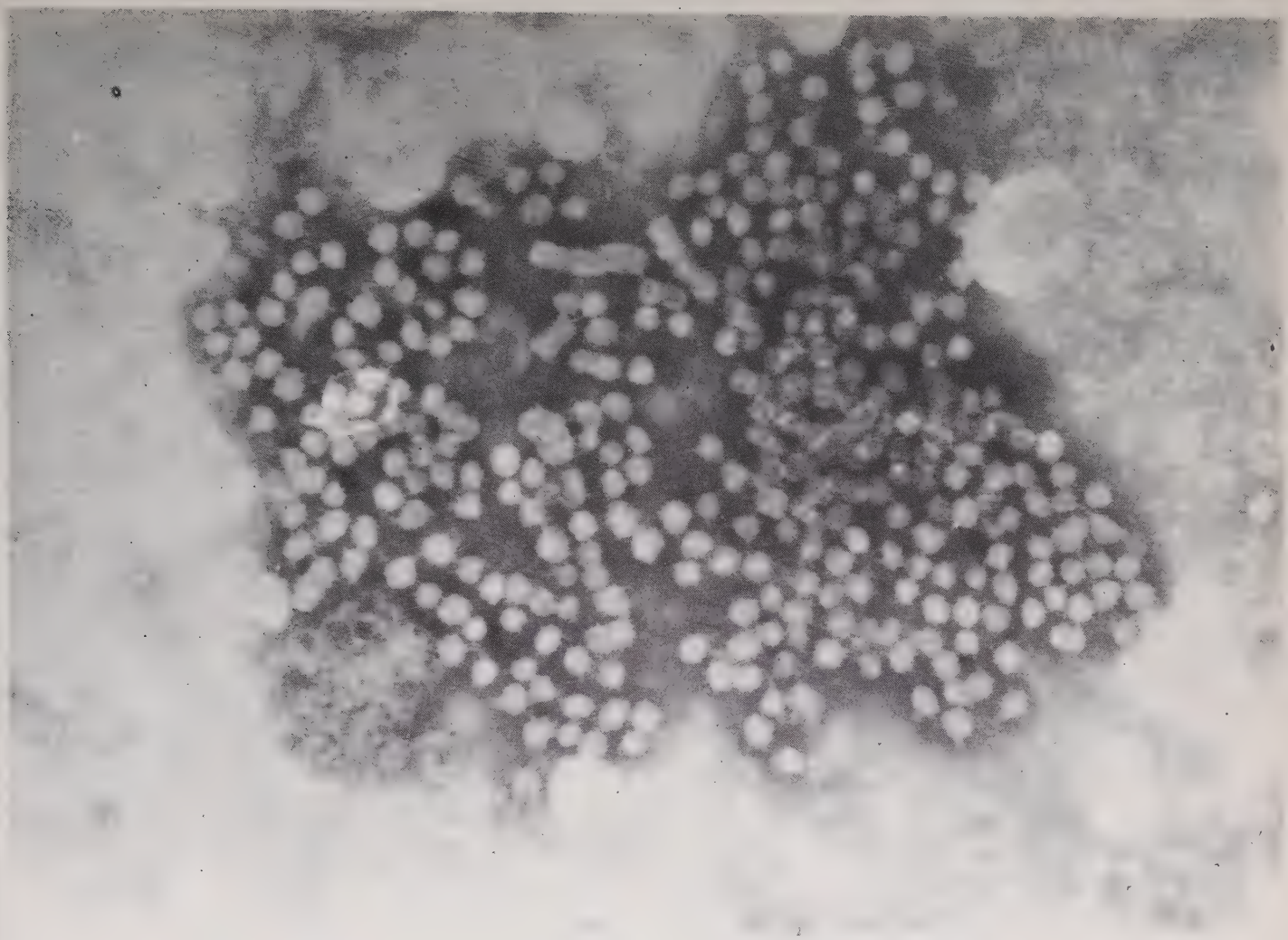


Planche 29 COMPLEXE Ag Au-Ac anti Au
Feutrage filamenteux liant les particules entre elles (immunoglobulines anticorps anti Au).
Grossissement : x 240.000

LIBÉRATION DE L'ANTIGÈNE AUSTRALIE DANS LE SANG AU COURS DES HÉPATITES

I - Apparition des particules d'Ag Au pendant la phase initiale

L'observation de M. RAM nous permet de constater la présence, dans le sang, deux mois avant une hépatite, de particules en cocarde qui ont été identifiées grâce au dosage radio immunologique et à la microscopie électronique.

D'après l'hypothèse initiale que nous avions émise en nous appuyant sur les travaux de Mella et Willems, ces structures correspondraient donc au virus B. Mais cette observation est isolée et de plus, elle présente un contexte clinique et thérapeutique particulier.

Sur les 4.000 prélèvements de sang étudiés, nous n'avons pas pu obtenir d'autres sérums correspondant à la phase préictérique d'une hépatite et les sérums les plus précoces (au début de l'hépatolyse) ont toujours montré la présence de l'Ag Au sous les morphologies habituelles (rondes et tubulaires en pourcentage variable avec dans quelques cas la forme en cocarde).

A notre connaissance, le cas de M. RAM est unique et il semble logique de penser que pour le malade, la chimiothérapie intensive depuis deux mois (Rubidomycine, cytostatique ayant comme propriété secondaire d'agir sur l'immunité dans le sens d'une dépression), a favorisé la bonne formation du virus de l'hépatite ; la quantité de particules est faible dans le sang (quelques amas par grille). La lyse cellulaire brutale des hépatocytes a libéré des formes immatures et anarchiques (particules sphériques de 16 nm).

II - La morphologie de l'Ag Au au moment de l'hépatolyse

Nous avons rencontré deux aspects différents :

a) **Dans les hépatites banales,** le titre de l'Ag Au croît brutalement et passe par un maximum puis diminue pour disparaître en une période allant de 3 jours à 5 mois.

Les prélèvements les plus précoces montrent un, deux ou trois types de particules mais avec prédominance des formes sphériques dans les proportions variant de 75 à 100 %.

Le nombre des formes tubulaires semble croître avec le temps de circulation dans le sang. Mais ce n'est pas un fait général. Il est difficile de relier la présence de ces formes tubulaires avec un état pathologique particulier (hépatite chronique ou "porteur sain" par exemple).

b) **Dans les hépatites chroniques et hépatites des leucémiques,** l'examen des sérums avant, pendant et après une élévation des transaminases plus importante correspondant à une rechute quelquefois consécutive à un arrêt de la corticothérapie,met en évidence un pourcentage de particules différent suivant la phase de l'hépatite considérée.

L'observation de M. RAM démontre que l'augmentation du titre de l'Ag Au donc du nombre de particules est consécutive à l'élévation des transaminases qui redeviennent normales alors que le titre de l'Ag Au se maintient. Les particules retrouvées dans le sang sont les formes sphériques, toutes identiques en dimension (16 nm).

Le cas de M. PHA nous a permis de constater que l'Ag Au n'est apparu dans le sang qu'un an environ après le début de l'hépatite. Dix recherches de l'Ag Au auparavant ont toutes été négatives et brusquement un Ag Au titrant 1/160 en E.I.D. est mis en évidence dans le sérum 15 jours environ avant une élévation brutale des transaminases correspondant à l'arrêt des corticoïdes. Les formes sphériques prédominent avec 80 % parfaitement structurées.

M. PHI révèle au moment de l'ictère un nombre de formes sphériques considérable avec 0,1 % de cocarde ; 5 jours plus tard, l'ictère ayant alors disparu mais les transaminases étant toujours élevées, le pourcentage des cocardes présentes est passé à 2 % soit une augmentation par un facteur 20.

M. GAR, l'hépatite évolue depuis trois mois avec présence de l'Ag Au dans le sang et un titre faible en E.I.D. Les particules sont représentées par des tubules agrégées en microcom-

plexes et brusquement il apparaît dans le sang 98 % de formes sphériques toutes agrégées en complexes de 20 à 50 particules correspondant avec une remontée transitoire des transaminases.

Ces quatre observations tendent à démontrer que l'Ag Au apparaît au moment de la lyse hépatique sous forme de particules sphériques, ce fait est d'importance considérable.

Toutes les observations retrouvées dans la littérature concordent pour dire que l'apparition de l'Ag Au est consécutive de l'hépatolyse entre 10 et 15 jours avant et une dizaine de jours après le début de l'augmentation des transaminases.

Une variation de titre de l'Ag Au permet d'incriminer directement celui-ci dans la lyse hépatique concomitante mais inversement une hépatolyse permanente sans variation de titre de l'Ag Au ne permet pas de penser qu'il n'est pas responsable de l'hépatolyse (M. MIX et M. GAR)

Ces aspects morphologiques différents nous font poser le problème du lieu exact de reproduction du virus. Il semblerait que la lyse hépatique avec apparition des particules sphériques toutes identiques en dimension soit un argument pour la multiplication du virus à l'intérieur des hépatocytes. Il doit exister dans l'organisme un foyer initial de reproduction du virus, le foie représentant un organe cible privilégié. La pénétration du virus dans l'hépatocyte pouvant se traduire par une multiplication puis lyse et libération massive et brutale des formes sphériques avec parallèlement une montée des transaminases.

Ce processus peut être épisodique, c'est-à-dire par infestation des hépatocytes transitoire, ou bien permanente mais modérée,la multiplication virale intra-hépatocytaire étant plus lente et aboutissant à une libération des différents types de particules.

L'hépatolyse dans l'hépatite virale ne paraît pas être seulement la conséquence d'une infestation par un agent pathogène capable de se multiplier avec des vitesses plus ou moins élevées mais est certainement d'une complexité beaucoup plus grande.

Nous pensons que le caractère de porteur chronique avec manifestation pathologique ou non est lié en particulier à la possibilité d'un foyer initial de multiplication virale extra-hépatique. Les particules viennent inonder le foie organe cible particulier, et pour des raisons que l'on ignore, le virus pénètre dans les hépatocytes, s'y multiplie d'une manière modérée et lente ce qui se traduit par une inflammation et une lyse hépatique, et de temps en temps une multiplication déchainante qui se traduit par une augmentation accentuée des transaminases et apparition de formes sphériques.

Inversement, l'apparition plus ou moins fugace de l'Ag Au au cours d'une hépatite banale serait la manifestation d'une multiplication virale purement intra-hépatocytaire et transitoire, sans autre foyer initial dans l'organisme.

Quel est le rôle exact de l'intestin ? des plaques de Peyer ? et de la circulation porte ? dans la dissémination du virus et en tant que foyer de multiplication initiale du virus ?

Il doit, à notre avis, jouer un rôle fondamental dans la physiopathologie de l'hépatite virale.

ETAT DE L'ANTIGÈNE AUSTRALIE

DANS LE SANG

EN RELATION AVEC LA CLINIQUE

SA PATHOGENIE

P L A N

1 - LES TYPES DE PARTICULES PRESENTES. - INFLUENCE DE L'ETAT IMMUNITAIRE DU SUJET.

2 - PERSISTANCE DE L'ANTIGENE AUSTRALIE DANS LE SANG.

3 - LES COMPLEXES IMMUNS

4 - PATHOGENIE DE L'ANTIGENE AUSTRALIE.

TABLEAU 17

		Nombres de cas étudiés	Nombres de cas avec cocardes dans le sang	Nombre de sujets avec cocardes / Moyenne du % de formes en cocarde	Moyenne du titre en E.I.D. de l'Ag Au
Porteurs sains d'Ag Au		7	1	1 / 2 %	1/8
Hépatite "banale"		10	1	1 / 10 %	1/30
Hépatite chronique		3	2	2 / 25 %	1/80
Leucémies	L.A.M	4	4	5 / 5 %	1/160
	L.L.C.	1	1		
Dialysés rénaux		2	2	2 / 30 %	1/240
Transplanté rénaux		4	4	4 / 40 %	1/520
Collagénoses	P.A.N.	1	1	1 / a 50 %	1/160
	Kaposi	1	1	1 / 5 %	1/10 (1/300)
Cirrhose et hépatite		3	3	3 / 30 %	1/10

I - LES TYPES DE PARTICULES PRESENTES - INFLUENCE DE L'ETAT IMMUNITAIRE DU SUJET.

Les formes sphériques de 20 nm sont les particules dominantes en nombre, retrouvées dans le sang des différents "porteurs d'Ag Au", donneurs de sang, hépatites aigues, chroniques, leucémies, dialysés, transplantés, collagénoses (P.A.N. et KAPOSI).

Elles sont libérées en grand nombre dans le sang au moment de l'hépatolyse lorsque la lyse cellulaire hépatique a un caractère que nous pourrons qualifier de brutal par suite d'une multiplication déchainante des virions.

Lorsqu'elles présentent un grand **pléomorphisme** en dimension et structure avec une ou même deux "capsides", les particules étant "propres" (c'est-à-dire avec les sous-unités visibles), il semble que ce soit d'un pronostic très mauvais qui aboutira à la mort. Nous l'avons constaté dans un cas précis : M. DAH., maladie de Kaposi, qui présente un Ag Au avec une morphologie bien particulière : un **pléomorphisme exceptionnel** des particules sphériques et tubulaires. Almeida (6) rapporte le même aspect dans les hépatites fulminans.

Les **formes tubulaires** sont présentes dans tous les cas cliniques étudiés. Peu nombreuses ou même absentes au début des hépatites, leur nombre semble augmenter avec le temps de libération dans le sang. Chez certains "porteurs chroniques", cette forme tubulaire peut devenir dominante. Leur longueur peut atteindre plus de 600 nm. Elles semblent traduire une certaine persistance de la multiplication et de la circulation dans le sang de l'Ag Au.

Les **formes en cocarde** : leur présence est inconstante contrairement aux deux formes précédentes. Leur dimension et leur structure sont sensiblement les mêmes dans tous les cas pathologiques observés et chez un même sujet dans tous les prélèvements de sang examinés dans le temps.

Leur apparition semble répondre à la loi du "tout ou rien". En effet, ou bien ces particules seront présentes chez un même sujet dans tous les prélèvements étudiés pendant toute la durée de persistance de l'Ag Au avec des pourcentages par rapport aux autres formes variant de 1 pour 10.000 à 70 % et même 100 % suivant les cas, ou alors elles seront absentes non seulement sur un prélèvement isolé mais sur tous les sérums prélevés pendant la durée de persistance de l'Ag Au. L'étude d'un grand nombre de cas permettrait d'avoir une idée plus précise sur la possibilité éventuelle de formation et de libération épisodique et éphémère des cocardes. Cossart a trouvé ces particules sur 9 sérums parmi les 46 examinés (55).

Dans notre étude, nous pouvons distinguer trois catégories de porteurs d'Ag Au en fonction du nombre de cocardes et du titre de l'Ag Au :(tableau 17.)

. le premier groupe comprend les porteurs sains et les hépatites que nous avons qualifiées de "banales" où les cocardes sont présentes dans 2 cas sur 17 soit seulement dans un peu plus de 10 % des sujets ; l'Ag Au a un titre faible ou très moyen (1/8 et 1/30 en E.I.D.)

. un deuxième groupe comprenant les leucémies, dialysés et transplantés, collagénoses (P.A.N. et KAPOSI), où, dans 13 cas sur 13 les cocardes sont retrouvées, soit dans 100 % des cas, avec un Ag Au titre élevé (1/160, 1/240, 1/520, 1/160)

. nous avons mis à part dans un troisième groupe les hépatites chroniques avec présence des cocardes dans 2 cas sur 3, soit 66 % avec un titre en Ag Au moyennement élevé. (1/80)

Nous avons exclu volontairement les 3 cas de cirrhose avec hépatite à Ag Au surajouté à cause des renseignements et de l'exploration clinique trop succinte que nous possédons de ces sujets ; seulement nous remarquons que la présence des cocardes n'est pas liée à un Ag Au avec un titre élevé, c'est-à-dire dont la multiplication virale est plus intense.

Nous avons recherché un lien étiologique possible entre les différents sujets du deuxième groupe permettant d'expliquer la constance des cocardes :

les leucémiques ont un état immunitaire particulier et sont tous traités par des

substances chimiques, cytostatiques douées de propriétés immunosuppressives dont le niveau d'action sur la sphère immunologique est différent suivant les produits mais tous interviennent par le seul fait d'empêcher la multiplication des cellules à reproduction rapide et en particulier donc agissent sur les lymphocytes et plasmocytes.

On peut les grouper en :

agents alcoylants avec

- les moutardes azotées parmi lesquelles sont utilisées la caryolysine (β chloroéty-lamine) mais surtout le chloraminophène (ou chorambucil),
- et les éthylènes imines : le thiotepa

Les **antimétabolites** les plus utilisés sont :

- Les antifoliques avec le methotréxate
- Les antipurines avec le purinethol (6 mercaptopurine) et son dérivé : l'imuran ou imurel (azathioprine)

Les 5 leucémiques étudiés ont tous été traités par une polychimiothérapie associant différemment et en alternant 1,2 ou 3 de ces substances immunosuppressives, avec en plus souvent, une corticothérapie (cortancyl) qui a pour résultat d'entrainer aussi une immuno-suppression.

Les 4 transplantés suivis ont été traités par l'azathioprine à des doses importantes, le but recherché étant la dépression immunitaire.

Les 2 dialysés, comme nous l'avons vu, présentent une dépression immunitaire, conséquence de l'urémie.

Les 2 sujets atteints de collagénoses sont peut-être à mettre à part car ils présentent une dépression de l'immunité cellulaire spontanée et ont été traités de plus au chloraminophène pour la P.A.N. et avec une polychimiothérapie : caryolysine, natulan, chloraminophène pour le KAPOSI. Tous ces malades ont en commun un état immunitaire particulier : réponses anticorps normales ou élevées, réponses cellulaires diminuées, auquel vient s'ajouter l'action immunodépressive de la chimiothérapie. On peut rapprocher cette constatation avec l'état de l'Ag Au dans leur sang ; l'Ag Au a un titre élevé (en EID de 1/160 à 1/520).

Les particules sont dispersées avec de 5 à 50 % de formes en cocarde. Il faut mettre à part les 2 collagénoses ; dans la P.A.N. 30 % de l'Ag Au est complexé 6 mois après le début de la maladie et après 3 mois de chloraminophène on ne retrouve plus que 5 % en agrégats donc on peut envisager une action de la chimiothérapie dans ce processus. Dans le Kaposi, l'Ag Au a un titre paradoxalement bas (1/10) qui ne reflète pas la quantité réelle de particules ; en effet étant donné la répartition en complexes (100 % de l'Ag Au est en agrégats de 20 à 40 éléments) on peut considérer que le titre théorique est de 1/300 : malgré une polychimiothérapie importante la répartition des particules reste totalement hétérogène.

La multiplication virale est donc intense chez tous ces sujets et le pourcentage élevé de cocarde semble traduire une bonne multiplication du virus. Il semble logique de penser que tout état immunitaire déficient ne peut que favoriser la multiplication virale. Aussi nous pensons que l'état immunitaire d'un individu conditionne directement l'aspect de l'Ag Au dans le sang ; autrement dit l'aspect de l'Ag Au peut-être un témoin de l'état immunitaire

II - PERSISTANCE DE L'Ag Au DANS LE SANG

Une relation a été faite entre la persistance de l'Ag Au dans le sang et l'état immunitaire particulier du sujet porteur (33). Les différents cas que nous avons pu étudier, viennent s'ajouter à ceux rapportés dans la littérature et nous permettent de distinguer 3 catégories de sujets :

- Ceux chez qui l'Ag Au apparaît transitoirement : ce sont les hépatites banales Il persiste entre 3 jours et 5 mois et dans quelques cas, il n'est même pas libéré dans le sang.

- Ceux qui ont un Ag Au dont la persistance est plus longue, avec des temps variant de 6 mois à 1 an et demi environ, caractérisés par un Ag Au dont le titre tend à diminuer progressivement parmi lesquels on peut rassembler les leucémies, les hépatites chroniques ; et, les transplantés et dialysés qui sont à la limite avec le groupe suivant.

- Enfin ceux qui gardent l'Ag Au avec un titre constant et qui sont les vrais "porteurs d'Ag Au" pendant plusieurs années qui groupent tous les "porteurs apparemment sains d'Ag Au" et quelques cas pathologiques particuliers (syndrome de Down et lèpre lèpromateuse).

On conçoit aisément les problèmes que soulève la présence de l'Ag Au dans le sang.

Plusieurs mécanismes biologiques sont imbriqués : d'une part on peut évoquer l'hypothèse de Blumberg selon laquelle le fait d'être porteur d'Ag Au est un caractère génétique : le gène Au1 récessif présent en double dose induit la persistance de l'Ag Au dans le sang ; d'autre part il faut penser que ce caractère de porteur d'Ag Au peut être transitoire (dans les hépatites), on conçoit dès lors moins bien une hypothèse purement génétique de ce phénomène. Et il faut avoir à l'esprit le caractère pathogène de cet Ag Au : un sang Ag Au + transfusé transmet une hépatite dans un fort pourcentage de cas, d'où l'hypothèse de la nature virale de ces particules. Par ailleurs l'état immunitaire du sujet semble influer directement sur la persistance de l'Ag Au dans le sang, lequel est responsable d'une pathologie chez certains sujets et chez d'autre il inonde le sang, sans provoquer de dommage apparent pour le porteur.

L'imbrication d'un caractère génétique qui induirait la possibilité d'infestation d'un individu par un virus, avec le rôle de son immunité sur la persistance de cet Ag Au représente des notions dont les mécanismes profonds restent à élucider.

III - LES COMPLEXES IMMUNS

La répartition hétérogène des particules d'Ag Au sur les grilles de M.E. permet de penser comme nous l'avons vu qu'un anticorps anti Au est responsable de cette agrégation particulaire.

L'aspect, la composition et les dimensions de ces complexes varient suivant les cas cliniques et chez un même sujet en fonction du temps.

Nous classerons en deux catégories les sujets étudiés :

a) **Ceux qui ont toujours eu une répartition homogène de l'Ag Au dans leur sang**

Les porteurs sains d'Ag Au, les leucémiques, les dialysés et transplantés rénaux, 2 des 3 hépatites chroniques, et les hépatites "banales" avec Ag Au fugace. Tous ces sujets n'ont jamais eu d'images de complexes dans leur sang.

b) **Ceux qui ont présenté des images de complexes d'Ag Au**

- avec évolution dans le temps :

. 1 cas de L.A.M. (M. RAM) qui a montré des complexes de cocardes en excès d'Ac deux mois avant une hépatite puis dispersion de ces formes et apparition des formes rondes au moment de l'hépatite.

. 1 cas d'hépatite chronique (M. GAR) avec Ag Au de titre faible à l'état de complexes avec excès d'Ac, ces microcomplexes ont circulé dans le sang pendant trois mois puis dispersion de toutes les particules à la suite d'une libération accrue d'Ag Au et maintien à l'état dispersé pendant plus de 7 mois.

. Plusieurs cas d'Hépatites dont l'évolution a duré entre 2 et 5 mois qui ont montré dès le début de l'affection des particules agrégées mais toutes en excès d'Ag Au, avec des proportions variables des différentes particules ; une corrélation semble pouvoir être faite entre l'élévation du titre de l'Ag Au au début de l'affection, avec des complexes volumineux et un

pourcentage de cocardes élevé et l'évolution longue avec une hépatite sévère aboutissant quelques fois à un processus sclérogène évolutif.

c) **Ceux qui ont présenté des complexes pendant toute la durée de l'étude de l'Ag Au**

1 - Périartérite noueuse (P.A.N.) (M. POI)

Cas intéressant qui a montré la persistance des complexes circulants en excès d'Ag Au pendant 11 mois. Au début micro-complexes de cocardes en léger excès d'Ag Au, 11 mois après complexes mixtes en gros excès d'Ag Au dispersé avec quelques rares mais volumineux agrégats de cocardes.

Il faut tenir compte chez cette malade de l'interférence et de l'activité immuno suppressive du chloraminophène qui a vraisemblablement modifié son état immunitaire et par voie de conséquence la synthèse d'Ac anti Au.

2 - Une maladie de Kaposi

L'Ag Au est présent en complexes de 20 à 30 particules des 3 types présentant un **pléomorphisme extraordinaire.** Ces complexes sont équilibrés ; la stabilité et le maintien de ces complexes traduit une réponse anticorps importante et constante. L'anarchie des structures est le reflet d'un conflit entre le virus et la cellule hôte qui semble la conséquence d'une immunité cellulaire et humorale particulière.

De ces observations se dégage un principe que nous voulons souligner. L'apparition dès le début et quelquefois ayant l'hépatite (traduction clinique et biologique de l'infestation par le virus) de complexes d'Ag Au dans le sang, paraît être la démonstration de la réponse humorale anti virale qui est concomitante avec la libération de l'Ag Au dans le sang. Notion importante pour mieux comprendre la physiopathologie des hépatites virales.

Certains ont déjà montré que l'apparition d'un anticorps anti Au pouvait précéder l'apparition de l'Ag Au dans le sang au cours d'une hépatite (177) cette constatation est fondamentale. Ici on peut voir apparaître d'abord l'anticorps, traduction de l'infestation virale, puis le virus,dans le sang,qui est brutalement libéré en grande quantité.

Le deuxième point important que nous voulons souligner est le fait suivant : dans deux cas (M. GAR et M. ROC) nous avons pu constater que les complexes Ag Au Ac anti Au sont présents dans le sang pendant des périodes respectives de 3 et 1 mois : cela traduit une réponse humorale qui se maintient avec parallèlement une multiplication continue de l'Ag Au. On assiste en fait à un véritable conflit permanent : synthèse d'anticorps et multiplication virale. Cette réponse d'Ac est limitée chez M. GAR, léger excès d'Ac du début, mais quantité d'Ag Au faible (EID 1/4 en moyenne) ce qui permet de penser que la faible quantité d'Ag Au libérée est incapable de neutraliser et d'épuiser l'Ac synthétisé ; c'est à la suite d'une libération accrue et massive d'Ag coïncidant avec une rechute de l'hépatite clinique et biologique que peu de temps après, l'Ag Au est retrouvé libre dans le sang, la réponse anticorps ayant été semble-t-il freinée ou inhibée. Chez M. ROC la quantité d'Ag Au est plus massive dès le début et la réponse Ac – limitée ; l'inondation par l'Ag Au semble avoir bloqué la réponse d'Ac. Cela nous permet d'envisager et de comprendre peut être que l'inondation par l'Ag viral venant massivement et d'une manière répétée épuiser l'Ac dans le sang semble finalement bloquer la réponse anticorps.

Le maintien de la réponse anticorps serait fonction de la quantité d'Ag synthétisée. Toute libération massive d'Ag Au inhibe la synthèse d'Ac. Venant à l'appui de cette hypothèse nous avons les 5 cas d'hépatites avec libération et **apparition d'Ac** précipitant sans Ag Au décelable dans le sang et pour deux d'entre eux l'assurance que l'Ag Au n'a pas été libéré dans le sang pendant la phase préictérique.

Nous ne savons pas si la réponse humorale a toujours lieu, mais la lyse cellulaire et l'inondation massive de l'Ag Au épuise et semble inhiber la synthèse d'Ac anti Au.

Lorsque l'Ag Au n'est pas libéré ou avec un titre très faible, dans quelques cas, un Ac précipitant peut apparaître dans le sang.

IV - PATHOGENIE DE L'ANTIGENE AUSTRALIE

Nous voulons émettre quelques hypothèses sur le rôle de l'Ag Au circulant dans le déclenchement de quelques symptômes et phénomènes pathologiques.

La conception que nous nous faisons de l'Ag Au est indispensable à rappeler avant d'aborder ce chapitre difficile car les arguments décisifs nécessaires font défaut.

L'Ag Au est donc représenté par un ensemble de **particules organisées.** Les formes rondes et les tubules représentant des réarrangements incomplets de capsomères sous forme cubique ou hélicoïdale. La cocarde représente le virus parfaitement structuré. Les particules sont soit dispersées, soit agrégées entre elles par un anticorps anti Au, réalisant de véritables complexes Ag Ac circulant : les dimensions de ces agrégats varient de 100 nm à 2 microns de diamètre.

L'Ag Au traduction sérologique de la présence du virus B est en fait une entité antigénique qui regroupe le virus B lui même et ses formes immatures. Nous pourrions parler de pathogènie du virus B ou sous un terme plus large de maladies viro-induites.

1) L'hépatite à virus est elle une maladie sérique ? L'Ag Au peut-il en être l'Ag figuratif ?

Almeida et Waterson (6) en s'appuyant sur l'observation de 3 cas d'hépatites, aigue, chronique, et fulminante avec respectivement une absence d'anticorps, une réponse modérée et une réponse intense concluent en émettant l'hypothèse d'une maladie sérique pour l'hépatite. La sévérité d'une hépatite serait donc fonction de la balance entre la production d'Ac et d'Ag. Une réponse d'anticorps particulièrement importante donne naissance à des complexes immuns provoquant un véritable choc anaphylactoïde aboutissant à la mort dans le cas de l'hépatite fulminans.

Les mécanismes profonds intervenant dans le pronostic et la sévérité d'une hépatite nous paraissent beaucoup plus complexes et difficiles à déterminer à l'heure actuelle. Les nombreux cas que nous avons pu suivre nous permettent de dire que l'hépatite à virus B ne paraît pas correspondre à une maladie sérique avec l'Ag Au comme Ag figuratif. En effet la distinction entre hépatite aigue et chronique ne semble pas basée sur une balance entre la synthèse d'anticorps et la production d'Ag ; par exemple M. PHA n'a jamais eu de complexes circulants : il en est de même de M. MIX où la réponse d'anticorps semble avoir été totalement absente et tous les deux ont une hépatite chronique.

On peut envisager que la réponse anticorps intense avec parallèlement une multiplication déchainante du virus dans l'hépatite fulminans donnent naissance à des complexes immuns qui contribuent à l'aboutissement mortel par un phénomène d'Arthus par complexes Ag Ac précipitant ; dans ce cas on peut parler de maladie sérique.

2) Pathologie des complexes d'Antigène Australie

Frank Dixon (67) a montré le premier le rôle pathogène des complexes antigène anticorps circulant et a réalisé expérimentalement la maladie du sérum. Par injection chez l'animal de complexes immuns, ou injection quotidienne d'une quantité d'Ag hétérologue calculée de manière à neutraliser les anticorps produits en réponse à une immunisation antérieure, des lésions glomérulaires sont nettement mises en evidence.

Les complexes immuns dont la nocivité est ainsi démontrée sont les complexes solubles de grande taille (constante de sédimentation supérieure à 19 s) formés en excès modéré d'antigène et capable de fixer le complément. Les lésions glomérulaires sont dues au dépôt de complexes immuns dans la paroi des petits vaisseaux et aux phénomènes inflammatoires qui en sont la conséquence.

On est en droit d'invoquer le rôle pathogène déterminant des complexes immuns lorsqu'on parvient à démontrer la présence de ces complexes dans la circulation ou mieux au niveau des organes lésés (191).

L'Ag Au est présent dans les hépatites à virus B, mais n'apparaît pas être libéré dans la circulation dans tous les cas d'hépatite : son apparition comme nous l'avons vu pouvant être fugace (3 jours) mais aussi beaucoup plus longue "5 mois et plus."

a) **les arthralgies**

L'apparition des complexes d'Ag Au, dans les hépatites lorsqu'elle a lieu, est en général précoce ; ils sont le plus souvent en excès d'Ag (excès variable suivant les cas) mais peuvent être aussi équilibrés ou en excès d'anticorps (M. GAR et M. RAM). La constatation du pouvoir anticomplémentaire des sérums des sujets atteints d'hépatite avec une assez grande fréquence et cela surtout pendant la phase initiale de l'hépatite est à rapprocher avec la présence de complexes pendant cette période. La balance Ag Au, Ac anti Au suivant l'équilibre atteint ou le déséquilibre vers un excès d'Ag ou Ac, pourra se manifester par des symptômes dont la gravité et le maintien dans le temps sera directement fonction de la qualité, de la quantité et de la dimension des complexes présents. Parmi la symptomatologie rencontrée au cours des hépatites on peut noter en particulier les arthralgies et myalgies. En effet la fréquence des manifestations douloureuses des articulations au cours des hépatites a été soulignée récemment aux Etats Unis ; cette constatation nous paraît de toute importance dans la corrélation que l'on peut faire avec les complexes circulants : agents habituellement incriminés dans ces manifestations douloureuses.

Il faut remarquer tout de suite que le facteur quantitatif doit être introduit pour comprendre l'importance des phénomènes douloureux. L'évaluation d'un nombre de complexes ne peut qu'être approximative, comme toutes les déterminations quantitatives en microscopie électronique. L'immunofluorescence pratiquée sur des culots de centrifugation de sérums Ag Au + pourrait être un moyen de visualiser les complexes présents et de les numérer au microscope optique.

Le cas de P.A.N. paraît significatif par la présence des complexes Ag Au en grand nombre et le syndrome polyarticulaire présenté par la malade dès la phase initiale de la maladie et persistant (30 % de l'Ag Au est encore complexé 6 mois après sa découverte).

b) **Action sur le rein**

Dans les 2 cas de collagénoses que nous avons suivi, nous avons retrouvé le même syndrome d'insuffisance rénale. L'atteinte glomérulaire a été faible pour la P.A.N. mais sévère pour le KAPOSI et très vraisemblablement responsable de la mort du malade en urémie.

Le rein représente l'organe cible pour les complexes immuns ; l'insuffisance de filtration glomérulaire semble être la conséquence directe du dépôt des complexes d'Ag Au dans les parois vasculaires dont la pénétration est favorisée par les substances vasodilatatrices libérées par les plaquettes agrégées qui agissent directement sur la perméabilité vasculaire.

On sait que les complexes d'Ag Au provoquent l'agrégation des plaquettes (166). La comparaison entre la qualité et le nombre des complexes circulants dans la P.A.N. et le KAPOSI et le rapprochement avec l'insuffisance rénale qui est modérée et limitée pour la P.A.N. et mortelle pour le KAPOSI nous paraît très significative. Un argument de poids aurait été apporté par la biopsie rénale, mais elle n'a pas pu être réalisée dans les deux cas. Tout de même il semble que l'on puisse parler de néphropathies par complexes immuns c'est-à-dire en fait viro-induites.

L'atteinte rénale semble relativement fréquente dans les hépatite virales avec protéinurie occasionnelle, hématurie microscopique ; la ponction biopsie rénale a montré la quasi constance de lésions mineures consistant en altérations de cellules des tubules, et un œdème interstitiel ; dans un certain nombre de cas on observe aussi des lésions glomérulaires.

La mise en évidence des complexes dans certaines hépatites avec Ag Au surtout pendant la phase initiale est à rapprocher avec l'atteinte rénale qui fait partie de la symptomatologie rencontrée dans les hépatites virales. La pathogénie de l'Ag Au au niveau du rein sous forme de complexes apparait hautement probable.

c) Pathogénie de l'Ag Au dans la P.A.N. et le KAPOSI

Les deux collagénoses étudiées : P.A.N. et Kaposi, sont intéressantes à considérer ensembles.L'Ag Au est dans le sang sous forme de complexes. Le rôle pathogène des complexes d'Ag Au dans le déclenchement de la périartérite a été envisagé (89). L'action nocive des complexes immuns sur les vaisseaux a été montrée chez l'animal. Dans notre cas, (M. POI),nous avons pu montrer la présence d'Ag Au sous forme complexée en partie dès les premiers symptômes de la P.A.N. Il faut savoir que l'Ag Au n'est présent que dans 50 % des cas de P.A.N. et celle-ci est souvent associée, dans des conditions de chronologie variable, à une hépatite ; et l'Ag Au lorsqu'il est présent est persistant dans le sang. Aussi on a pu considérer que l'hépatite à virus pourrait représenter une modalité étiologique de la P.A.N. se développant en réponse à la circulation des complexes d'Ag Au. (226).

A notre connaissance, la relation entre Kaposi et Ag Au n'a pas encore été faite et le cas que nous rapportons paraît être le premier. L'aspect de l'Ag Au est tout à fait exceptionnel et est identique à celui rencontré dans les hépatites graves mortelles : des complexes immuns équilibrés ou en très léger excès d'Ag. L'Ag Au a-t-il un rôle dans le déclenchement de cette angiofibrosarcomatose ? Nous n'avons pas d'arguments pour l'envisager. L'histologie d'hépatite présentée par le foie montre cette imbrication et pose le problème de la relation Ag Au - collagénose.

Ces 2 collagénoses présentent en commun le même état immunitaire particulier se traduisant par une réponse anticorps qui se maintient à côté de la multiplication virale.

d) Action sclérogène sur le foie

Le rôle exact du virus au niveau du foie n'apparaît pas encore clairement ; mais il ne fait pas de doute que la dégénérescence sclérogène du foie pouvant aboutir à une véritable cirrhose irréversible puisse être imputée à la multiplication virale au niveau de la cellule hépatique. Les faits cliniques et la démonstration d'une multiplication virale au niveau du noyau et du cytoplasme des hépatocytes sont des arguments importants pour envisager l'action pathogène du virus.

ESQUISSE D'UNE HYPOTHÈSE D'UN MECANISME DE TOLÉRANCE IMMUNITAIRE ACQUISE POUR EXPLIQUER LA PERSISTANCE DE L'AG. AU.

Pour expliquer la persistance de l'Ag Au dans le sang, on peut évoquer un phénomène de tolérance spécifique acquise de l'organisme pour cet Ag, et de nombreux arguments appuient cette hypothèse.

La tolérance peut se définir par 2 critères : on dit qu'un organisme est tolérant pour un Ag considéré,

1) lorsque cet Ag persiste dans le sang, son élimination n'étant pas plus rapide que celle des propres constituants de l'individu.

2) lorsque l'apparition d'anticorps fait défaut.

Parmi les mécanismes d'induction de la tolérance chez l'adulte, il faut retenir **l'inondation par un Ag**. Elle a été montrée par Dixon (67) en transfusant un lapin par des dizaines de millilitres de sérum hétérologue ; il a obtenu une tolérance immunologique, c'est-à-dire que l'organisme n'éliminait pas ces substances étrangères plus vite que ses propres constituants. Ce phénomène de tolérance par inondation nous paraît être directement applicable aux cas de l'Ag Au pour plusieurs raisons. En effet, la conjonction de différentes observations, bien que nous n'ayons pas une expérimentation précise, nous permet d'envisager cette hypothèse.

1 - Le fait que l'Ag Au puisse persister chez certains sujets 5 ans et plus traduit une tolérance de l'organisme pour l'Ag considéré,

2 - La dynamique de libération dans le sang et de disparition de l'Ag Au, étudiée sur quelques cas, montre que son apparition n'est pas obligatoirement concomitante avec le début de l'hépatite.

La persistance future de l'Ag Au paraît être fonction de l'importance de la libération de l'Ag Au initiale. Toute apparition massive d'Ag (titre 1/80 - 1/160 en E.I.D.) tendra à provoquer son maintien dans le sang pendant une période prolongée : cas des dialysés, transplantés, leucémiques, hépatites prolongées chroniques, P.A.N. Les courbes de disparition de l'Ag chez M. MON. et M. PHA. semblent significatives à ce sujet (cf tableau 4 et 11). Pour M. MON, le titre passe de 1/620 au 1/10 en 6 mois. De même pour M. PHA, il évolue de 1/160 au 1/40 en 6 mois.

3 - L'apparition d'un Ac précipitant décelable en I.D. ou E.I.D. est une exception dans les hépatites avec Ag Au.L'observation des 5 cas d'hépatites avec Ac anti Au laisse supposer que la non-libération de l'Ag Au dans le sang (qui a pu être vérifiée dans 2 cas avant l'hépatite) permet la synthèse et l'apparition d'un Ac précipitant décelable en I.D.

Pour expliquer la fréquence des Ac anti Au chez les polytransfusés, (18 % des hémophiles ont un Ac précipitant) on peut penser à une réponse anamnestique apparaissant après une immunisation par un Ag lipoprotéique inerte mais dont les motifs antigéniques ne sont pas entièrement masqués. La première transfusion Ag Au + transmet une hépatite biologique totalement inapparente ou frustre ou bien se traduit par une simple multiplication virale sans atteinte hépatique. Dans tous les cas, il y a libération d'Ag Au dans le sang ; libération qui vient bloquer le début d'une réponse Ac ; et parallèlement on observe l'installation d'une hypersensibilité (2-242). Au cours d'une nouvelle transfusion par un Ag Au lipoprotéique, l'hypersensibilité empêche la réinfestation cellulaire, et il y a réinduction et apparition d'un Ac anti Au.

4 - La microscopie électronique vient confirmer ces observations. La mise en évidence d'agrégats de particules 2 mois avant une hépatite (M. RAM.) et au début de plusieurs cas d'hépatites, puis la disparition de ces agrégats à la suite d'une libération accrue d'Ag traduit qu'une synthèse d'Ac a bien eu lieu avant ou au début d'une hépatite, puis son épuisement et l'inhibition de sa synthèse sont survenus.

La morphologie des particules est un reflet fidèle de l'activité des foyers de multiplication virale et d'autre part de leur persistance (particules non phagocytées). Le cas de M. PHA. montre que le foyer de multiplication virale a tari et l'on observe la transformation progressive des particules dans le temps : c'est une désagrégation lente, une transformation par incorporation vraisemblable de lipoprotéine dans leurs structures traduites par l'augmentation des dimensions de ces particules puis leur aspect difforme et leur contraste accentué (particules plus "blanches"). Il est probable que cette gangue lipoprotéique plasmatique fasse perdre en partie aux particules leur antigénicité.

- Un dialysé (Planche 7) montre avec précisions les 2 éventualités rassemblées : les particules anciennes, volumineuses, difformes, semblant enveloppées d'une couche de lipoprotéines plasmatiques, ayant perdu ainsi leur antigénicité, avec parallèlement des particules tubulaires, bien structurées, régulières, représentant des particules "neuves", témoins de l'activité d'un foyer de multiplication virale persistant. C'est le seul cas que nous ayons rencontré. Toutes les études dynamiques que nous avons pu faire traduisent que la multiplication virale est en général rapide et éphémère (hépatites banales). Mais elle peut aussi se maintenir un temps plus long étant donné l'existence d'un foyer initial. (M. MIX, M. ROC, M. GAR, et 1 cas de dialysé). Et pourrait se maintenir chez certains sujets sans atteinte hépatique apparente quelques années.

En conclusion, contrairement aux autres viroses connues, la possibilité rencontrée dans le cas de l'hépatite à virus B de déverser dans le sang, avec une grande fréquence, une quantité phénoménale de virus et formes immatures, permet d'envisager un retentissement certain sur le processus immunitaire en cours. 4 cas peuvent être envisagés.

1) Un foyer initial extra-hépatique a provoqué un début d'immunisation, se traduisant par une petite synthèse d'Ac ; la pénétration du virus dans les hépatocytes, sa multiplication, l'hépatolyse et l'inondation massive dans le sang viennent épuiser l'Ac et bloquer sa synthèse par inhibition périphérique,

2) L'activité du foyer initial peut se maintenir quelques temps puis tarir ; les particules libérées dans la circulation ne seront plus phagocytées, ce qui aboutira à un Ag Au persistant et s'éliminant à la vitesse des propres constituants de l'organisme (les leucémies, certaines dialysés et transplantés, le cas de P.A.N.)

3) D'autre part, on peut envisager l'absence d'un foyer initial vraiment actif et l'essaimage du virus dans le sang est très éphémère, sans que la réponse immunitaire humorale se déclenche obligatoirement. Le virus pénètre dans l'hépatocyte, s'y multiplie activement ; l'hépatolyse libère les particules dans le sang avec un titre peu élevé. Le foyer initial n'existant pas, l'Ag Au est rapidement phagocyté par les macrophages du S.R.H. et son titre diminue rapidement et il disparait (hépatites banales).

4) Enfin, un dernier cas est celui d'un foyer initial qui libère des virus dans le sang en permanence, ils sont phagocytés régulièrement, et il s'établit un équilibre ; le titre de l'Ag reste sensiblement constant, avec des particules "neuves" à 100 %, (M. MIX') ou bien avec un pourcentage réduit mais qui se maintient dans le temps (Dialysé). Ce sont les vrais porteurs chroniques d'Ag Au, que nous avons qualifiés de "porteurs apparemment sains d'Ag Au" ou bien "porteurs chroniques actifs".

CONCLUSION

Après avoir rappelé la "naissance" de l'Ag Au, puis son adolescence avec la liaison étroite avec l'hépatite à virus B, nous avons exposé les techniques d'études de l'Ag Au et standardisé l'E.I.D. que nous avons pu utiliser en semi-quantitatif par la détermination de titres en Ag Au, notion importante pour suivre la dynamique de l'Ag Au dans le sang : son apparition, sa persistance et sa disparition au cours des hépatites ictériques ou anictériques. Nous avons pu voir ainsi que dans deux cas d'hépatite chronique l'Ag Au n'est apparu dans le sang que plusieurs mois après le début de l'hépatite. D'autre part, nous avons pu identifier l'Ag Au sous forme de "cocarde" 60 jours avant une hépatite à Ag Au, ce qui est à rapprocher des observations de Havens (107), Paul (165) et Neef (154) qui, respectivement, ont mis en évidence le virus, 16, 60 et 87 jours avant les manifestations cliniques et biologiques d'une hépatite.

Mais c'est certainement la microscopie électronique qui nous a permis d'objectiver et de voir ce que représentait exactement cette antigénicité Australie présentée par certains sangs dits : Ag Au +, concept purement immunologique pouvant se rattacher à une simple protéine ou lipoprotéine, en quantité anormalement élevée dans les hépatites à virus B et chez certains sujets apparemment sains.

La microscopie électronique nous a donné la possibilité de faire un pas supplémentaire par la mise en évidence d'arrangements moléculaires structurés, témoins d'une individualité, supportant la spécificité Ag Au +.

Bien que l'identification d'un acide nucléique n'ait pas totalement abouti et que la culture sur cellule n'ait pu être encore réalisée, il n'y a aucune équivoque, ni aucun doute dans notre esprit : l'Ag Au est plus qu'un marqueur sérologique de la présence du virus B et il représente un ensemble de particules organisées qui réunissent : le virus B (particules en cocarde), les différentes formes immatures du virus ou virions (particules sphériques et tubulaires), des formes intermédiaires (en raquette, en tétard, en massue, etc), des formes totalement anarchiques (très rares) et des formes de dégradation par incrustation lente et progressive et formation d'une gangue lipidique d'origine plasmatique venant transformer progressivement toutes les structures initiales, les formes en cocarde étant les plus résistantes.

La microscopie électronique apparait comme une méthode de choix et parmi les renseignements multiples qu'elle nous donne :

Elle permet d'apprecier :

1- **La morphologie des particules présentes et les types particulaires rencontré**

a) soit bien structurés, avec des sous-unités visibles, c'est ce que nous appelons des particules "neuves" témoins de l'activité des foyers de multiplication virale.

b) soit à structure remaniée, contour peu net, irrégulier, "blanchâtre, avec une gangue lipoprotéique d'origine plasmatique. La présence de ces particules traduit le tarissement du foyer de multiplication virale et la persistance de ces particules dans le sang.

soit à structure floue, cotonneuse, "très blanche", bourgouflée. Ce sont des particules en voie de dégradation lente, qui traduisent le tarissement du foyer de multiplication virale depuis déjà un temps assez long, au moins un an, et l'élimination progressive à la vitesse des constituants plasmatiques.

2- **Les pourcentages des différentes formes.** On peut ainsi voir la prédominance de certains types particulaires suivant l'état du sujet porteur.
. Il semble exister une corrélation entre l'état immunitaire du sujet et la présence des cocardes ; autrement dit, toute immunosuppression pathologique ou médicamenteuse tendrait à favoriser la multiplication du virus B complet dans le sang
. Les particules sphériques sont libérées en grand nombre au moment de l'hépatolyse.
. Les particules tubulaires semblent augmenter en nombre chez certains porteurs chroniques à foyer de multiplication actif et persistant.

3 - **La répartition sur les grilles des particules.**

a) soit isolées les unes des autres, ce qui traduit l'absence de réponse immunitaire de type humoral ou bien l'installation d'un état de tolérance.

b) soit réparties de manière hétérogène, ce qui manifeste la présence d'un anticorps anti Au précipitant, donc une réponse immunitaire de type humoral et par conséquent la présence de complexes Ag Au Ac anti Au immuns circulants. Suivant le pourcentage de particules agrégées par rapport à celles qui restent isolées, on peut définir. :

- des complexes en excès d'Ag Au, les plus fréquents.
- des complexes équilibrés en excès d'Ac lorsqu'on ne retrouve pas de particules isolées.

4 - L'aspect quantitatif

La microscopie électronique ne peut et ne pourra pas être une technique quantitative fine, dans les conditions où nous travaillons. Les facteurs conditionnant l'adsorption des particules sur les grilles sont nombreux et difficiles à standardiser. Mais dans des conditions rigoureuses de technique, on peut effectuer une estimation quantitative et une étude comparative. En comptant sur 100 champs microscopiques pris dans un ordre donné le nombre de particules et en évaluant le nombre moyen de particules par champ, nous estimons ainsi que le nombre de particules virales varie suivant les sérums Ag Au + de 10^6 à 10^9 et dans quelques cas à 10^{10} par ml de sérum ! .

De même on peut évaluer le nombre de complexes présents: pour M. DAH, maladie de Kaposi à évolution foudroyante et insuffisance rénale progressive avec mort en urémie, 1 mois avant sa mort, nous estimons à 10^5/ml le nombre de complexes immuns présents.

Il nous est apparu au cours de cette étude que l'état de l'Ag Au dans le sang semblait refléter directement la réactivité immunitaire de l'hôte, de type humoral et de type cellulaire, bien que nous n'ayons aucune notion expérimentale précise sur cette dernière.

Que l'état immunitaire intervienne sur le caractère aigu ou grave d'une hépatite et sur la prolongation, le passage à la chronicité, cela nous paraît à peu près certain. Par contre, vouloir parler de maladie sérique pour une hépatite aigue, prolongée ou chronique, avec l'Ag Au comme Ag figuratif, nous semble non fondé et les observations que nous avons pu faire infirme l'hypothèse initiale d'Almeida et Waterson.

Il nous parait très précoce, et quant à nous peu probable, de vouloir incriminer directement l'Ag Au dans la genèse de la périartérite noueuse même si certaines observations permettent de l'envisager (la nôtre en particulier). L'hypothèse d'un pouvoir oncogène éventuel du virus B pouvant induire la sarcomatose de Kaposi ou les hépatomes (bien que de nombreuses corrélations aient été faites entre le cancer primitif du foie et l'Ag Au), n'a aucun argument de poids qui permette de l'envisager à l'heure actuelle.

Par contre, que l'Ag Au à l'état de complexes immuns en excès d'Ag puisse être responsable de la syniptomatologie souvent rencontrée dans les hépatites virales nous parait hautement probable, en particulier les **arthralgies et myalgies et l'atteinte rénale** qui peut être légère et réversible, mais qui peut devenir irréversible et mortelle par atteinte glomérulaire dans le cas de la maladie de Kaposi que nous avons pu suivre.

L'inondation massive par un virus dans le sang n'a jamais été rapportée à notre connaissance dans d'autres viroses. Elle permet d'ailleurs d'envisager et de comprendre certains bouleversements apportés dans la réponse immunitaire particulière de l'hépatite à virus B, où l'on voit persister l'Ag Au dans le sang alors que le foyer de multiplication virale a tari et où l'apparition d'un anticorps précipitant est une exception.

Quel est le pouvoir infectant des différentes particules ? Nous pensons que les cocardes et certaines particules sphériques "à centre plein" qui viennent d'être libérées dans le sang sont infectantes. Cela reste à démontrer. Il semblerait que les échecs des essais de culture sur cellules du virus soient dus en partie au fait que la souche virale utilisée n'est peut-être pas choisie soigneusement, et deux impératifs nous semblent importants: choisir un sang Ag Au – riche en cocardes et qui viennent d'être libérées dans le sang.

L'Hétérogénéité de l'Ag Au permet peut-être d'interpréter les résultats trouvés par J.P. SOULIER en fixation du complément (205 - 206) ; seulement 10 % des anticorps anti Au sont capables de reconnaître tous les antigènes Australie et, d'autre part cela permet peut-être de comprendre les subspécificités de l'Ag Au identifiées par LE BOUVIER. (131)

Enfin tous les essais d'immunisation des animaux par un Ag Au purifié n'ont pas tenu compte jusqu'à présent de la **qualité de l'Ag Au**, c'est-à-dire si l'on avait un Ag Au "neuf" dans le sang ou bien ancien ; la structure étant différente, on conçoit les erreurs d'interprétation que cela peut entraîner par la suite.

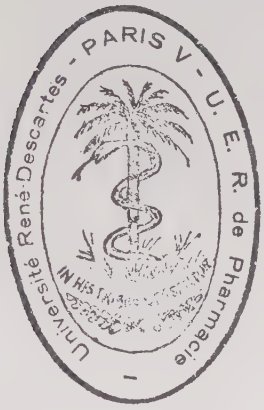
Le concept d'antigène Australie basé sur son pouvoir immunogène et sur les méthodes immunologiques de détection et d'identification nous apparait maintenant dépassé ; la microscopie électronique nous a permis de concrétiser sous formes de particules organisées cette "antigénicité" et nous aurions pu intituler ce travail : le virus de l'hépatite B dans le sang.

Paris, le 19 Juin 1972

Vu et permis d'imprimer

Le Vice-Président de l'Université

Paris V,



G. Dillemann.

BIBLIOGRAPHIE

1 - AACH, R.D. et al. -A radioimmunoassay for detection of Australia antigen and anti-Australia antigen antibodies.
CLIN. RES., 1970 18, 618

2 - AGARWAL, S.S. ; BLUMBERG, B.S.; GERSTLEY, B. J.S et LEEB L.A.
Lymphocytes transformation and hepatitis.
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1971, 137, 4, 1498

3 - ALARCON - SEGOVIA, D ; FISHBEIN, E; - Detecting H.A.A in small quantities
LANCET, 1971, 1, 7701 - 7702

4 - ALMEIDA, J.D. - Election microscope variations seen in Australia Antigen - Positive sera . International Children's Centre Paris, June 14, 15, 16 (1971)

5 - ALMEIDA, J.D. - Electron microscope findings in the field of serum hepatitis.
PROC. ROY. SOC. MED., 1971, 64, 276

6 - ALMEIDA, J.D.& WATERSON, A.P. - Immune complexes in hepatitis.
LANCET, 1969, 2, 983-986

7 - ALMEIDA, J.D.; KUTATILAKE, A.E. & al. - Possible airborne spread of serum hepatitis virus within a haemodialysis unit.
LANCET, 1971, 849

8 - APOSTOLOV, K. ; BAUER, D.J.; SELWAY, J.W.T.; SHERLOCK,S. - Australia antigen in urine.
LANCET, 1971, 1, 7712, 1274-1275

9 - ARMENIO, L.; VIOLANTE, N. & CECI, A.- Caratterizzazione immunoematologica e chimico-fisica dell' autoanticorpo in un caso di anemia emolitica autoimmune in corso di virus-epatite in un lattante .
CLIN. PEDIAT., 1968, 50, 776-773

10 - ARNAUD, R.;MAUPAS, P.; AUDURIER, A. & AVRIL, J. - Présence et spécificité de l'antigène Australie et de l'anticorps correspondant.
HEMATOLOGIA, 1970, 4, 327-332

11 - ASHCAVAI, M. & PETERS, R.L.– Hepatitis-associated antigen : improved sensitivity in detection.
AMER. J. CLIN. PATH., 1971, 55, 262 - 268

12 - ATHANASSIADES, T. et al. . - Corticosteroids in the treatment of viral hepatitis in children. A clinicopathological comparative study.
AMER. J. DIS. CHILD., 1967, 114, 253-260

13 - ATTIYEH, M. - Australia antigen (A review).
J. MED. LIBAN, 1970, 23, 365-369

14 - BABUDIERI, B. et al. - Presence of virus-like bodies in liver cells of patients with infectious hepatitis.
J. CLIN. PATH., 1966, 19, 577-582

15 - BAGSHAWE, A. F.; PARKER, A.M. & JINDANI , A.-Hepatitis-associated antigen in liver disease in Kenya.
BRIT. MED. J., 1971, 1, 88-89

16 - BAKER, A.; SIDEL, J. & KAPLAN, M. - Australia antigen positive hepatitis complicated by acute polyarteritis.
GASTROENTEROLOGY, 1971, 60, 183

17 - BANKE, O. et al. -Australia antigen and antibody in 10.000 Danish blood donors.
LANCET, 1971, 1, 860-861

18 - BARINSKY, I.F.; ANAN'EV, V.A. & SINAJKO, G.A.- Serological study of virus strains isolated from patients with epidemic hepatitis (Botkin's disease)
ZH. MIKROBIOL. (MOSK.), 1964, 41, 120-125

19 - BARKER, L.F. et al.- Some antigenic and physical properties of virus-like particles in sera of hepatitis patients.
J. IMMUNOL., 1969, 102, 1529-1532

20 - BARKER, L.F. et al. - Transmission of serum hepatitis.
J. AMER. MED. ASS., 1970, 211, 1509-1512

21 - BAYER, M.E.; BLUMBERG, B.S. & WERNER, B.-Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's syndrome and hepatitis.
NATURE, 1968, 218, 1057-1059

22 - BERSON, S.A. and YALOW, R.S. - Immunoassay of protein hormone ; The hormones, vol. IV p. 557 (Pincus, Thimann and Astwood) ACAD. PRESS., NEW-YORK 1964

23 - BLAINEY et al. - Is the urine infective in serum hepatitis ?
LANCET, 1971, 1, 797

24 - BLUMBERG, B.S. - Polymorphism of the serum proteins and the developpement of isoprecipitins in transfused patients.
BULL. N.Y. ACAD. MEC., 1964, 40, 377

25 - BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J.; RIDDELL, N. & ERLANDSON, M. - Multiple antigenic specificities of serum lipoproteins detected with sera of transfused patients.
VOX. SANG., 1964, 9, 128

26 - BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J. & VISNICH, S. - A "new" antigen in leukemia sera.
J. AMER. MED. ASS., 1965, 191, 541-546

27 - BLUMBERG, B.S.; ALTER, H.J. - Precipitating antibodies against a serum protein (Australia antigen) in serum of transfused hemophilia patients.
J. CLIN. INVEST., 1965, 44, 1029

28 - BLUMBERG, B.S.- Production of antibody against "Australia antigen" in rabbits.
NATURE, 1966, 210, 1340.

29 - BLUMBERG, B.S.; MELARTIN, L.; GUINTO, R.S. & WERNER, B.- Family studies of a human serum isoantigen system. (Australia antigen)
AMER. J. HUM. GENET., 1966, 18, 594.

30 - BLUMBERG, B.S. et al.- A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia and hepatitis.
ANN. INTERN. MED., 1967, 66, 924-931

31 - BLUMBERG, B.S. et al.- Hepatitis and leukemia : their relation to Australia antigen.
BULL. N. Y. ACAD. MED., 1968, 44, 1566-1585

32 - BLUMBERG, B.S.; FRIEDLANDER, J.S.; WOODSIDE, A.; SUTNICK, A.I. and LONDON, W.T. Hepatitis and Australia antigen : autosomal recessive inheritance of susceptibility to infectious in humans.
PROC. NAT. SCI. U.S.A., 1969, 62, 1108

33 - BLUMBERG, B.S.; SUTNICK, A.I. & LONDON, W.T. - Australia antigen and hepatitis.
J. AMER. MED. ASS., 1969, 207, 1895-1896

34 - BLUMBERG, B.S.; SUTNICK, A.I. & LONDON, W.T. - Australia antigen as a hepatitis virus Variation in host response.
J. AMER. MED., 1970, 48, 1-8

35 - BLUMBERG, B.S. et al. - Viral hepatitis and tests for the Australia (Hepatitis - associated) antigen and antibody.
BULL. ORG. MOND. SANTE, 1970, 42, 957-992

36 - BLUMBERG. B.S. - Lepromatous leprosy and A.A. with comments on the genetics of leprosy.
J. CHRONIC. DIS., 1970, 23, 507-516.

37 - BOGGS, J.D.; MELNICK, J.L.; CONRAD, M.E. & FELSHER, B.F. - Viral hepatitis.Clinical and tissue culture studies.
J. AMER. MED. ASS., 1970, 214, 1041-1046

38 - BOLIN, V.S.; CHASE, B.S. & ALSEVER, J.B. - A virus-latex agglutination test for detecting antibodies against isolates associated with viral hepatitis.
AMER. J. CLIN. PATH., 1968, 49, 635-646

39 - BORY, J.-Les immunodépresseurs et leurs utilisations.
Conférence faite à l'occasion des journées pharmaceutiques françaises, maison de la Chimie - Mars 1969.

40 - BOURNE, J.G. - H.A.A. at the barber's ?
LANCET, 1970, 2, 879

41 - BRENNER, S. and HORNE, R.W. - Negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses
BIOCH. BIOPH. ACTA, 1959, 34, 103

42 - BRUGUERA, M. et al. - Hepatitis-associated antigen in epidemic hepatitis.
LANCET, 1971, 1, 549

43 - BRZOSKO, W.; KRAWCZYNSKI, K.; MADALINSKI, K. & NOWOSI WSKI, A. Recherches sur l'antigène australien dans les affections du foie.
BULL. ACAD. NAT. MED. (Paris), 1970, 154, 8-16

44 - BRZOSKO, W.J. et al.-Antigenic determinants on Australia antigen particles.
LANCET, 1970, 1, 1058

45 - BULKLEY, B.; HEIZER, W.D.; GOLDFINGER, S.E.; ISSELBACHER, K.J. & SHULMAN, N.R. - Distinctions in chronic active hepatitis based on circulating hepatitis-associated antigen.
LANCET, 1970, 2, 1323-1326

46 - CAROLI, J. et HECHT, Y.- Progrès en Hépatologie
REVUE DU PRAT.1966, 16, 31 bis, 42

47 - CARVER, D.H.; SATO, D.S.Y.- Production of Hemadsorption-negative areas by serum containing Australia antigen.
SCIENCE, 1971, 172, 3989, 1265-1267

48 - CHANG, L.W. & O'BRIEN, T.F. - Australia antigen serology in the Holy Cross football team hepatitis outbreak.
LANCET, 2, 59-61

49 - CHICOT, D.- Intérêt pratique de la recherche de l'antigène "Australia" en transfusion sanguine et dans le diagnostic des hépatites virales.
Ronéotypé, 86p. Thèse. Médecine. Paris. 1970 Nº 632

50 - CONSTANTINESCO, N. et al.- Aspects de l'immunité dans l'hépatite virale (H.V.)
PRESSE MED., 1967, 75, 1879-1882

51 - COSSART, Y. et al. - Australia-SH antigen in hepatitis patients in London.
BRIT. MED. J., 1969, 3, 755-756

52 - COSSART, Y.E. & VAHRMAN, J. - Studies of Australia-SH antigen in sporadic viral hepatitis in London.
BRIT. MED. J., 1970, 1, 403-405

53 - COSSART, Y.E. et al. - Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis.
LANCET, 1970, 1, 848.

54 - COSSART, Y.E. - What is Australia Antigen ?
International Children's centre
Seminar on viral hepatitis Paris June 1970, 14, 15, 16

55 - COSSART, Y.E. and al - Morphology and immunological properties of Australia/SH antigen in hepatitis.
MICROBIOS 1971, 3 (9) 5-14

56 - COULERU, O.; GERMAN, A ; BOUSQUET, O ; et SARRAZIN, A - Immune complexes in large particles of Australia Antigen in Polyarteritis.
LANCET, 1972, 7744, 1, 445, 446

57 - COULERU, O. ; MOULIAS, R.; GERMAN, A. - Evolutive morphology of the Australia Antigen
AMERICAN J. DIS. CHILD. 1972, 123, 318

58 - COULERU, O.; PETER, F.; PANOUSE-PERRIN, J. and GERMAN, A.-
The successive morphology of virus particles in a case of hepatitis with Australia Antigen.
REV. EUR. ET. CLIN. BIOL 1972 XVII, 743-

59 - COULERU, O. Etude Immunologique et en microscopie électronique de l'Antigène Australie
D.E.R.B.H. (Immuno-Hématologie) (en préparation).

60 - CROSS, G.F.; WAUGH,; FERRIS, A.A.; GUST, I.D. & KALDOR, J. - Virus-like particles associated with a foecal antigen from hepatitis patients and with Australia antigen.
AUST. J. EXP. BIOL. MED. SCI., 1971, 49, 1-9

61 - CULLIFORD, B.J. - A new method for precipitation reactions on forensic blood, semen and saliva stains.
NATURE, 1964, 201, 1092

62 - DANE, D.S. et al.- Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis.
LANCET, 1970, 1, 695-698

63 - DAS, P.C.; CASH, J.D.; & CUMMING, R.A.- A method for production of antibody to hepatitis-associated antigen in rabbits.
BRIT, J. HAEMAT., 1971, 20, 363-367

64 - DEL PRETE,S.; COSTANTINO, D. &. DOGLIA, M -Antigène Australia. Dimostrazione di diversi determinanti antigeni e dei loro corrispondenti anticorpi.
BOLL. IST. SIEROTER. MILAN., 1970, 49, 56-65

65 - DEL PRETE,S.; CONSTANTINO, D.; DOGLIA, M.; GRAZIINA, A.; AJDUKIEWICZ, A.; DUDLEY, F.J.; FOX, R.A. & SHERLOCK, S. - Detection of a new serum-antigen in three epidemics of short-incubation hepatitis.
LANCET, 1970, 2, 579-581

66 - DEL PRETE, S. ; COSTANTINO, D. & DOGLIA, M.- Different Australia-antigen determinants in acute viral hepatitis.
LANCET, 1970, 2, 292-294

67 - DIXON, F.J. et MAURER, P.H.
J. EXP. MED. 1955, 101, 245

68 - DOUGLAS, S.D. et al. - Electron microscopy of Herpes-like particles in lymphoid suspension cultures derived from patients with acute viral (serum) hepatitis.
J. VIROL., 1969, 3, 520-524

69 - DOXIADIS, et al.- Down's syndrome and infectious hepatitis.
LANCET, 1970, 1, 897

70 - ELLING, P.; NIELSEN, J.O. & DIETRICHSON, O. - Australia antigen in patients with various liver diseases.
ACTA PATH. MICROBIOL. SCAND., 1970, 78-B, 657-663

71 - EYQUEM, A.; SAINT-MARTIN, J. de & LEVADITI, J.C. - L'antigène Australie et la transmission de l'hépatite virale aux singes.
REV. FRANC. TRANSFUS., 1970, 13, 275-284

72 - FABER, V.; CHRISTOFFERSEN, P. ; NIELSEN, P.E.; NIELSEN, J.O. & POULSEN, H.- Au antigen in liver cirrhosis.
LANCET, 1970, 2, 825-826

73 - FAUVERT, R. - Histoire de l'antigène "Australie"
REV. PRAT. (PARIS), 1970, 20, 2479-2483

74 - FELDMAN, G - Communication personnelle.

75 - FERRIS, A.A. et al. - Faecal antigen in viral hepatitis.
LANCET, 1970, 2, 243-244

76 - FIELD, A.M. & COSSART, Y.E. - Specificity of Au antibodies.
LANCET, 1971, 2, 7715,91

77 - FIORENZO PARONETTO. - Textbook of Immunopathology. vol 2, 722-732
PA Miescher et H.O.Muller - Eberhardt edit. 1969

77' - FORTE, G.M.; NICHOLS, A.V., GLASER, R.M
CHEM. PHYS. LIPIDS, 1968, 2, 396-408

78 - FOUTS, D.W.; BYRNE, E.B. & ISRAEL, H.L. - Hepatitis - associated antigen and sarcoidosis
LANCET, 1970, 2, 1257

79 - FOX, R.A.; NIAZI, S.P. & SHERLOCK. S. - Hepatitis-associated antigen in chronic liver disease.
LANCET, 1969, 2, 609-612

80 - FOX, R.A. et al. - An epidemic of hepatitis in a renal dialysis Unit.
PROC. ROY. SOC. MED., 1971, 64, 277-278

81 - GATEAU P.-Antigène Australia. Rapports avec l'immuno-électrophorèse, les anticorps antitissus et l'histologie. Etude à propos de 196 sujets.
110 p. Thèse. Médecine. Paris. N° 614

82 - GERIN, J.R.; HOLLAND, P.V.; PURCELL, R.H - Australia antigen : Large scale Purification from Human Serum and Biochimical Studies of Its Proteins. J. VIROL, 7, 5, 569

83 - GERIN, J.R.; PURCELL, R.H.; HOGGAN. M.D.; CHANOCK, R.M. - Biophysical properties of Australia antigen.
J. VIROL. 1969. 4. 5. 763-768

84 - GERMAN, A.; COULERU, O. ; PANOUSE-PERRIN, J.; et PETER, F. - L'Antigène Australie et les agents des hépatites. Comptes-rendus de standardisation Internationale de Microbiologie. Edition Karger à Bâle 1972.

85 - GILES, J.P. & KRUGMAN,S. - Viral hepatitis. Immunoglobulin response during the course of the disease.
J. AMER. MED. ASS. 1969, 208, 497-503

86 - GILES, J.P. et al. - Viral hepatitis. Relation of Australia/SH antigen to the Willowbrook. MS-2 strain.
NEW ENGL. J. MED., 1969, 281, 119-122

87 - GILLESPIE, A. et al. - Neonatal hepatitis and Australia antigen.
LANCET, 1970, 2, 1081

88 - GITNICK, G.L. et al. - Australia antigen in chronic active liver disease with cirrhosis.
LANCET, 1969, 2, 285-288

89 - GOCKE, D.J.; HSU, K.; MORGAN, C.; BOMBARDIERI, S.; LOCKSHIN, M. & CARISTIAN,C.L. - Association between polyarteritis and Australia antigen.
LANCET, 1970, 2, 1149-1153

90 - GOCKE, D.J. et al. - Correlation of A.A. with posttransfusion hepatitis.
J. AMER. MED. ASS., 1970, 212, 877-879

91 - GOCKE, D.J. et al. - Experimental viral hepatitis in the dog : production of persistent disease in partially immune animals.
J. CLIN. INVEST., 1967, 46, 1506-1517

92 - GOCKE, D.J. & KAVEY, N.B. - Hepatitis antigen. Correlation with disease and infectivity of blood donors.
LANCET, 1969, 1, 1055-1059

93 - GOCKE, D.J. & HOWE, C. - Rapid detection of Australia antigen by counter-immunoelectrophoresis.
J. IMMUNO , 1970, 104, 1031-1032

94 - GOESER, E. ; LONDON, T.; SUTNICK. A.; BLUMBERG, B. & SENIOR, J. - Short incubation post-transfusion hepatitis in recipients of blood containing Australia antigen.
GASTROENTEROLOGY, 1970, 58, 1026

95 - GOLDBY, S. - Experiments at the Willowbrook State School
LANCET, 1971, 1, 749

96 - GOYAL, R.K.; SHULMAN, R.J.; POWELL,; POWELL, H.C.; HOLLINGER, F.B.; MELNICK, J.L. & HERSH, T. - Australia antigen in Down's syndrome.
GASTROENTEROLOGY, 1971, 60, 181

97 - GRIVAUX, C. - Etude de l'Antigène Australie dans une unité d'hémodialyse et de transplantation rénale. Thèse médecine. 1970

98 - GROB, P.J. & JEMELKA, H. - Antibodies against Australia antigen in laboratory personnel.
LANCET, 1971, 1, 77

99 - GROB, P.J.; JEMELKA, H.J. & MÜLLER, J.W. - Australien-Antigen bei akuter und chronischer Hepatitis.
PRAXIS, 1971, 60, 230-237

100 - GROB, P.J. & JEMELKA, H.J. - Faecal SH (Australia) antigen in acute hepatitis.
LANCET, 1, 206-208

101 - GUARDIA, J. et al.-Australia antigen in Spain.
LANCET, 1970, 1, 1007

102 - GUST, J.D.; KALDOR, J. & NASTASI, M.-Absence of Au antigen in faeces of patients with Au-positive sera.
LANCET, 1971, 1, 797

103 - GUST, J.D. et al. - Virus-like particles in Australia antigen associated hepatitis
LANCET, 1970, 1, 953

104 - HADZIYANNIS, S.J. et al.-Australia antigen in a family.
LANCET, 1970, 1, 1057-1058

105 - HADZIYANNIS, S.J. et al.-Hepatitis-associated antigen in chronic liver disease.
LANCET, 1970, 1, 100

106 - HARTWELL, W.V. et al. - Description of a viral agent found in blood obtained from patients with infectious hepatitis.
APPL. MICROBIOL, 1970, 19, 521-526

107 - HAVENS, W.P.; WARD, J.Jr; DRILL, U.A. & PAUL, J.R. - Experimental production of Hepatitis by feeding, icterogenic material. PROC. SOC. EXP. BIOL., 1944, 57, 206

108 - HAWKES, R.A. - Australia antigen and viral hepatitis in Sydney. A hospital series.
MED. J. AUST., 1970, 2, 519-525

109 - HILL, D.A.; WALSH, J.H.; PURCELL, R.H. - Failure to demonstrate circulation interferon during incubation period and acute stage of transfusion associated hepatitis.
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 1971, 136, 3, 853-856

110 - HIRSCHMAN, R.J. et al. Virus-like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis.
J. AMER. MED, ASS., 1969, 208, 1667-1670

111 - HUGGINS, C.E.; BLUMBERG, A.; GIGER, K. & GRADY, G.F. - Hepatitis in hemodialysis units.
NEW ENGL. J. MED., 1970, 283, 657-658

112 - JACOBS, C & LEGRAIN, M.- A propos d'une épidémie d'hépatite dans un centre d'hémodialyse chronique.
J. UROL. NEPHROL., 1968, 74, 333-341

113 - JANOUT, V.; HELCL, J.; KOZA, J.; RAMPAS, J.; TUPY, L. & KLIMES, A. - The Au/SH antigen patient sera from a prospective study on viral hepatitis.
J. HYG. EPIDEM., 1971, 15, 93-100

114 - JOKELAINEN, P.T.; KROHN, K.; PRINCE, A.M. & FINLAYSON, N.D.C. - Electron microscopic observation on virus-like particles associated with SH antigen.
J. VIROL., 1970, 6, 685-689

115 - JONES, P.O. et al.-Viral hepatitis. A staff hazard in dialysis units.
LANCET, 1967, 1, 835-840

116 - JOZWIAK, W.; KOSCIELAK, J. ; MADALINSKI, K. et coll. - RNA of Australia antigen.
NAT. NEW BIOL., 229, 92-94, 1971

117 - KABOTH, V. et al. - Australia (SH) - Antigen-Befunde bei Leberkranken und Blutspendern
DTSCH. MED. WSCHR., 1970, 95, 2157-2165

118 - KAPLAN, M.M. & GRADY, G.-Serum-hepatitis antigen in chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis.
LANCET, 1971, 1, 159-161

119 - KNIGHT, A.H.; FOX, R.A. ; BAILLOD, R.A.; NIAZI, S.P. ; SHERLOCK, S. & MOORHEAD, J F. - Hepatitis-associated antigen and antibody in haemodialysis patients and staff.
BRIT. MED. J., 1970, 3, 603-606

120 - KOGON A.; KROHMAL, R. & PERTERSON, D.R. - Viral hepatitis and Down's syndrome.
LANCET, 1967, 1, 615

121 - KOLK-VEGTER, A.J.; BOSCH, E. &. VAN LEEUWEN, A.M. - Influence of serum hepatitis on haemoglobin level in patients on regular haemodialysis,
LANCET, 1971, 1, 526-528

122 - KOZA, J, et al. - Study on the Au-SH antigen,
J. HYG. EPIDEM., 1970, 14, 214-220

123 - KRECH, U. et al. - Australia antigen in newborn babies
LANCET, 1970, 1, 779

124 - KROHN, K.; FINLAYSON, N.D.C.; JOKELAINEN, P.T.; ANDERSON, K.E. & PRINCE, A.M - Electron microscopical and immunological observations on the serum-hepatitis (SH) antigen in primary biliary cirrhosis.
LANCET, 1970, 2, 379-383

125 - KRUGMAN, S.; GILES, J.P. & HAMMOND, J. - Hepatitis virus; effect of heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strains.
J. INFECT. DIS., 1970, 122, 432-436

126 - KRUGMAN, S.; GILES, J.P. & HAMMOND, J. - Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical epidemiological and immunological types of infection.
J. AMER. MED. ASS. 1967, 200, 365-373

127 - KRUGMAN, S. et al. - Viral hepatitis - New light on an old disease.
J. AMER. MED. ASS., 1970, 212, 1019-1029 and 1051-1058

128 - KRUGMAN, S. & WARD, R. - Hepatites virales. In : Clinique virologique. R. Debré et J.H. Celers,
Ed. - Paris, Ed. Méd. Flam. 1970, 415-436

129 - KRUGMAN, S. - Viral hepatitis and Australia antigen
J. PEDIAT., 1971, 78, 887-891

130 - KUCERA, J. - Infectious hepatitis and Down's syndrome.
LANCET, 1971, 1, 549

131 - LE BOUVIER, G.L. - Subspecificities of the Australia antigen complex.
International Children's Centre.Seminar on viral hepatitis, Paris June, 1971

132 - LEMAIRE, A. - Les hépatites virales et l'antigène australien.
PROGR. MED. (Paris), 1970, 98, 345-352

133 - LESKI, M.; GRIVAUX, G. & COUROUCE-PAUTY, A.M. - L'antigène Australie dans l'unité d'hémodialyse périodique et de transplantation rénale.
PRESSE MED., 1971, 79, 391-394

134 - LIEBHABER, H.; PROSE, P.H. et al. - Studies of a myxovirus recovered from patients with infectious hepatitis. 1 - Isolation and characterization. 2 - Fine structure and electron microscopic demonstration of intracytoplasmic internal component and viral filament formation.
J. EXP. MED., 1965, - 122, 1135-1160

135 - LONDON, W.T. et al. - Australia antigen and viral hepatitis.
REV. ETUD. CLIN. BIOL., 1969, 14, 961-963

136 - LONDON, W.T.; DIFIGLIA, M. & RODGERS, J. - Failure of transplacental transmission of Australia antigen.
LANCET, 1969, 2, 900

137 - LONDON, W.T. et al. - An epidemic of hepatitis in a chronic-hemodialysis unit. Australia antigen and differences in host response.
NEW ENGL. J. MED., 1969, 281, 571-578

138 - LONDON, W.T. ; SUTNICK, A.I. & BLUMBERG, B.S. - Australia antigen and acute viral hepatitis,
ANN. INTERN. MED., 1969, 70, 55-59

139 - LOUS, P. ; OLESEN, H. & SKINHOJ, P. - Hepatitis-associated (Au/SH) antigen determination in 10.000 patients in a Copenhagen general hospital.
LANCET, 1970, 2, 119-121

140 - LYONS, K.P. & GUZE, L.B. - A.A. associated hepatitis : radioimmunoassay in mother and infant. J.
J. AMER. MED. ASS., 1971, 215, 981

141 - McCOLLUM, R.W. et al. - Viruses in viral hepatitis.
LANCET, 1969, 1, 778-779.

142 - MAGNENAT, P. - L'antigène australien.
PRAXIS, 1970, 44, 1519-1520

143 - MATTLINGER, B. - Etude comparée de l'Antigène Australie chez des sujets sains, en cours d'hépatite et chez des malades atteints d'insuffisance rénale. Thèse, médecine ronéo, 34 p (1971)

144 - MATTHEW, E.B. - Possible absence of Australia antigen in G/G translocation-type Down's syndrome.
LANCET, 1971, 1, 702

145 - MAUPAS, P. - Antigène australien et virus de l'hépatite canine
C.R. SOC. BIOL. (Paris) 1970, 164, 387-389

146 - MAYNARD, E.P., ; SADIKALI, F. ; ANTHONY, P.P. & BARKER. L.F. - Hepatitis-associated antigen and cirrhosis in Uganda. LANCET, 1970, 2, 1326-1328

147 - MAYUMI, L. ; OKOCHI, K. and NISHIOKA, K. - Detection of Australia antigen by means of immune adherence haemagglutination test.
VOX. SANG., 1971, 20, 178-181.

148 - MELARTIN, L ; MYLLYALA, G. et PENTTINEN K. (Helsinki) - Detection of Au antigen by immunodiffusion and Platelet Aggregation Tests.
VOX. SANG. 1970, 19, 239-245

149 - MELIS, C. & RANQUE, J. - Dépistage du virus "Australia" en transfusion sanguine.
MARSEILLE-MED., 1971, 108. 115-118

150 - MELLA, B.A. and TASWELL,H.F. - Suppression of leucocytie mitotis by sera of hepatitis implicated donors.
Amer, J. Clin. Path., 1970, 53. 2, 141-144

151 - MELLA B.A. - Use of PHA - Stimulated lymphocytes cultures for detecting the agent of hepatitis
VOX. SANGUINIS, 17, 1, 45-49 (1969)

152 - MILLMAN,I.; ZAVATONE, V., GERSTLEY B.J.S. and BLUMBERG B.S. - Australia antigen in the nuclei of liver cells of patients with viral hepatitis by the fluorescent antibody technique NATURE 222, 181, 1969.

153 - MILLMAN, I., BOEB, L.A. ; BAYER, M.E. & BLUMBERG, B.S. - Australia antigen (a hepatitis-associated antigen). Purification and physical properties
J. EXP. MED., 1970, 131, 1190-1199.

154 - NEEFE, J.R. & STOKES, J. Jr. - An epidemic of infectious Hepatitis apparently due to a water borne agent. Epidemiologic observations and transmissions experiments in human volunteers.
J.A.M.A., 1945, 128, 1063

155 - NISHIOKA, K. Measurements of complement by agglutination of human erythrocytes reacting in immune adherence.
J. IMMUNOL. 90, 86-97, 1963.

156 - NELSON, J.M.; BARKER, L.F. & DANOVITCH, S.H. - Intranuclear aggregates in the liver of a patient with serum hepatitis.
LANCET, 1970, 2, 773-774

157 - NIELSEN, P.E. et al. - (Australia-antigen in patients with acute and chronic liver diseases)
UGESKR. LAEG., 1970, 132, 875-879

158 - NORDENFELT, E. ; KJELLEN, L. - Presence and persistence of Australian antigen in a Swedish Hepatitis series.
ACTA PATH. MICROBIO. SCAND., 1969, 77, 489-494.

159 - NORDENFELT, E.; LINDHOLM, T. & DAHLQUIST, E. - A hepatitis epidemic in a dialysis unit. Occurence and persistence of Australia-antigen among patients and staff.
ACTA PATH. MICROBIOL. SCAND. 1970, 78-B, 692-700.

160 - NORDENFELT, E.; DAHLQUIST, E. - Presence and persistence of Australia antigen in patients with liver disorders, SCAND. S. INFECT. DIS., 1970, 2, 167-171.

161 - NOWOSLAWSKI, A. et al.-Inflammatory effect of Au-Antibody immune complexes.
LANCET, 1971, 1, 598

162 - OKOCHI, K. and MURAKAMI,S. - Observation on Australia antigen in Japanese.
VOX.SANG. 1968, 15, 374

163 - OKOCHI, K. - Australia antigen transfusion and hepatitis.
VOX. SANG, 1970, 18, 289-300

164 - OHBAYASHI, A. et al. - A.A. in familial cirrhosis.
LANCET, 1971, 1, 7692, 244.

165 - PAUL, J.R. - Endemic hepatitis away U.S. troops in post war Germany
PRO. ROY. SOC. MED., 1950, 43, 438

166 - PENTTINEN, K. - The platelet aggregation test in the study of Hepatitis.
International Children's seminar on viral Hepatitis, June Paris 1971.

167 - PESENDORFER, R.; KRASSNITZKY, O. & WŁWELKA F. - Immunelektrophoretischer Nachweis von Hepatitis associated-Antigen (Au/SH Antigen).
KLIN. WESCHR, 1970, 48, 1, 58-59

168 - PESENDORFER, F. & KRASSNITZKY, O. - Methoden der Au/SH antigen. Bestimmung Kongressberichte der Dtsch. bes. f. Bluttransf Giessen (Karger, Basel, im Druck).

169 - PIAZZA, M. & SALOMON, J.C. - Présence dans le contenu et la paroi de l'intestin des souris axéniques et classiques d'une substance inhibant le pouvoir infectieux du virus de l'hépatite de souris. C.R. ACAD. SCIE. (Paris), 1966, 262, 1159-1162.

170 - PRINCE, A.M. - An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. PROC. NAT. ACAD. SCI. (Wash.), 1968, 60, 814-821.

171 - PRINCE, A.M. - Relation of Australian and SH antigens.
LANCET, 1968, 2, 462-463

172 - PRINCE, A.M. - Relation between SH and Australia antigens.
NEW ENGL. J. MED., 1969, 280, 617

173 - PRINCE, A.M. et al. - The role of serum hepatitis virus in chronic liver disease.
TRANS. ASS. AMER. PHYCNS., 1969, 82, 265-277

174 - PRINCE, A.M. - Detection of serum hepatitis virus carriers by testing for the SH (Australia) antigen. A review of current methodology.
VOX. SANG., 1970, 19, 417-424.

175 - PRINCE, A.M. - Prevalence of serum-hepatitis-related antigen (SH) in different geographic regions. AMER. J. TROP. MED. HYG. 1970, 19, 872-879

176 - PRINCE, A.M. & BURKE, K. - Serum hepatitis antigen (SH) : rapid detection by high voltage immunoelectroosmophoresis.
SCIENCE, 1970, 169, 593-595.

177 - PRINCE, A.M. ; LEBLANC, L. ; KROHN, K.; MASSEYEFF, R. & ALPERT, M.E. - SH antigen and chronic liver disease.
LANCET, 1970, 2, 717-718

178 - PRINCE, A.M. et al. - Immunologic distinction between infectious and serum hepatitis.
NEW ENGL. J. MED., 1970, 282, 987-991.

179 - PRINGLE, R.C. ; McMICHAEL, S. & ROSS, C.A.C. - Laboratory tests for H.A.A.
LANCET, 1971, 1, 185.

180 - PURCELL, R.H.; HOLLAND, P.V.; WALSH, J.H. et al. - A complement fixation test for measuring Australia antigen and antibody. J. INFECT. DIS., 1969, 120, 383.

181 - ROPARS, C. ; CHICOT, D. ; CAVALIER, J.; HOMBERG, J.C. & SALMON, Ch. - Technique de détection de l'antigène Australie par électro-immuno-diffusion chez les donneurs de sang.
NOUV. REV. FRANC. HEM., 1970, 10, 3, 409-414.

182 - RAUNIO, V.K. et al. - Specificities of human antibodies to Australia antigen.
PROC. SOC. EXP. BIOL. (N.Y.), 1970, 134, 548-557.

183 - SAMA, S.K.; ANAND, S.; MALVIYA, A.N.; RAMACHANDRAN, K. & TANDON, B.N. - Australia/SH. antigen and immunoglobulins in an epidemic of viral hepatitis in India.
GASTROENTEROLOGY, 1971, 60, 181.

184 - SANWALD, R. & SAUERBRUCH, T. - Australia (SH) - Antigen bei Blutspendern und Empfängern.
DTSCH. MED. WSCHR., 1970, 95, 2153-2156

185 - SARAVIS, C.A. & BUNACKER, L. - Membrane-complement fixation test for hepatitis associated antigen.
NATURE, 1970, 228, 61-62

186 - SAVARIS, C.A. : TREY, C. & GRADY, G.F. - Rapid screening test for detecting hepatitis associated antigen.
SCIENCE, 1970, 169, 298-299

187 - SCHMIDT, N.J. & LENNETTE, E.H. - Complement fixation and immunodiffusion tests for assay of hepatitis-associated "Australia" antigen and antibodies.
J. IMMUNOL., 1970, 105, 604-613

188 - SCHROEDER, D.D. & MOZEN, M.M. - Australia antigen : distribution during Cohn ethanol fractiondtion of human plasma.
SCIENCE, 1970, 168, 1462-1464

189 - SCHWEITZER, I.L. & SPEARS, R.L. - Hepatitis-associated antigen (Australia antigen) in mother and infant.
NEW ENGL. J. MED., 1970, 283, 570-572

190 - SCOTTO, J. ; STRALIN, H. & CAROLI J. - Amas de particules viriformes dans les noyaux d'hépatocytes chez un sujet atteint d'hépatite virale mortelle et porteur de l'antigène Australia. C.R. ACAD. SCI. (Paris), 1970, 271, 1603-1604.

191 - SELIGMAN M.-L'importance des complexes immuns en pathologie.
La Nlle PRESSE MEDICALE, Novembre 1971, nº 0

192 - SERPEAU D. ; MANNONI, P. ; DHUMEAUX, D.; BERTHELOT, P. - Hepatitis-associated antigen in human bile.
LANCET, 1971, 2, 7736, 1266.

193 - SHARMA, O.P.; PETERS, R.L. ; ASHCAVAI, M. & BALCHUM, O.J. - Australia (hepatitis) antigen in sarcoidosis.
LANCET, 1970, 2, 928

194 - SHERLOCK, S. et al. - Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated (Australia) antigen in serum.
LANCET, 1970, 1, 1243-1247.

195 - SHERLOCK, S. ; FOX, R.A. ; NIAZI, S.P. & SCHEUER, J.P. - Hepatitis associated (Australia) antigen related chronic hepatitis and cirrhosis.
GASTROENTEROLOGY, 1970, 58, 1014.

196 - SHULMAN, N.R. - Hepatitis-associated antigen.
AMER. J. MED., 1970, 49, 669-692

197 - SHULMAN, N.R. & BARKER, L.F. - *Virus-like antigen, antibody, and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation*
SCIENCE, 1969, 165, 304-306.

198 - SIRTORI, C. - *Virus-like particles in infectious hepatitis.*
LANCET, 1970, 2, 824

199 - SKINHÖJ, P. & THULSTRUP, H. - *Hepatitis-associated antigen. Qualitative and quantitative determination.*
SCAND. J. CLIN. LAB. INVEST., 1971, 27, 61-66

200 - SOLAAS, M.H. - *Frequency of the Australia-SH antigen and antibody among Norvegian blood donors.*
SCAND. J. HAEMATOL., 1970, 7, 506-508

201 - SOLAAS, M.H.; HELLE, I. ; LAAKE, H. & BERG, K. - *Australia-SH antigen in patients with liver diseases.*
ACTA PATH. MICROBIOL. SCAND., 1971, 79-B, 163-164.

202 - SOULIER, J.P. - *Recherche de l'antigène Australie et de l'anticorps correspondant en transfusion sanguine.*
PRESSE MED., 1970, 78, 485-486

203 - SOULIER, J.P.; COUROUCE-PAUTY, A.M. & BENAMON-DJIANE, D. - *Complement fixation test : microtechnique used at the Centre National de Transfusion Sanguine.*
in BULL. WLD HLTH ORG. 1970, 42, 957-992

204 - SOULIER, J.P.; COUROUCE-PAUTY, A.M. & BENAMON-DJIANE, D. - *Recherche de l'antigène Australie et de l'anticorps correspondant.*
PRESSE MED., 1970, 78, 487-490.

205 - SOULIER, J.P. & GOZIN, D. - *Comparative study of techniques using complement activation for Australia antigen detection. Congrès International de standardisation Microbiologique - Annecy - France 1971.*

206 - SOULIER, J.P. & GOZIN, D. - *Standardisation des méthodes de fixation du complément pour la détection de l'Antigène Australie.*
NEV. REV. FRANC. HEMAT., 1971, 11, 3.

207 - SOULIER, J.P. - *Antigene et anticorps des hépatites à virus - l'antigène Australie -*
REV. FRANÇ. TRANSF. SANG. 1969, XII, 3, 303

208 - SOULIER, J.P.; COUROUCE-PAUTY, A.M. & BENAMON-DJIANE, D. - *Etude immunologique des hépatites à virus. Recherche de l'antigène Australie et de l'anticorps correspondant.*
REV. FRANÇ. TRANSF. SANG. 1969, XII, 3, 361

209 - SOULIER, J.P. - *The Australia Antigen - Hepatitis Associated Antigen (HAA) and Corresponding Antibodies.*
VOX. SANG., 1970, 19, 3-4

210 - SPANO, C. & DARDANONI, L. - *A myxovirus isolated from a case of infectious hepatitis.*
RIV. IST. SIEROTER. ITAL., 1967, 42, 169-180

211 - STEINBUCH, M. et AUDRAN R. - *Isolement de l'immunoglobuline IgG du plasma humain à l'aide de l'acide caprylique -*
REV. FRANC. ET CLIN., et BIOL. 1969, 14, 1054

212 - STEINRUCK, H. - *Australia-antigen und virus-nepatitis, Z. ARZTL. FORTBILD. (Berl.)* 1970, 64, 481-486

213 - STOLLER, A. & COLLMAN, R.D. - Viral hepatitis and Down's syndrome.
LANCET, London, 1966, 2, 859

214 - SUTNICK, A.J. - Anicteric hepatitis associated with Australia antigen.
J. AMER. MED. ASS., 1968, 205, 670-674

215 - SUTNICK, A.J.; LONDON, W.T.; BLUMBERG, B.S.; YANKEE, R.A.; GERSTLEY, B.J.S.; MILLMAN, I. - Australia antigen (a hepatitis-associated antigen) in leukemia.
J. NAT. CANCER INST., 1970, 44, 1241-1248.

216 - SUTNICK, A.J.; LONDON, W.T. & BLUMBERG, B.S. - Australia antigen : a genetic basis for chronic liver disease and hepatoma ?
ANN. INTERN. MED., 1971, 74, 442-443

217 - SUTNICK, A.J. et al. - Viral hepatitis revised concepts as a result of the study of Australia antigen. MED. CLIN. N. AMER, 1970, 54, 805-817.

218 - STEINBUCH, M. AUDRAN. R. - Isolement de l'immunoglobuline G du plasma humain à l'aide de l'acide caprylique.
REV. FRANC. ET CLIN. ET BIOL. 1969, 14,1054-1058

219 - SYMPOSIUM on virus hepatitis antigens and antibodies = the Australia antigen, hepatitis associated antigen (HAA) and corresponding antibodies. Ed. J.P. Soulier.
Munich, August 1970, VOX. SANG. (Basel), 1970, 19, 200-413

220 - TASSI, G.C. et al. - Purification of Australia antigen and preparation of the specific antiserum
BOLL. IST. SIEROTER., (Milan), 1970, 49, 336-340.

221 - TASSI, G.C. ; DE BARBIERI, A. & CROVARI, P. - Ricerche sulle caratteristiche dell' antigen Australia et del suo anticorpo specifico.
BOLL. IST. SIEROTER. (Milan), 1970, 49, 66-69.

222 - TASWELL, H.F.; SHORTER, R.; PONCELET, T.K. & MAXWELL, N.G. - Hepatitis-associated antigen in blood donor populations. Relationship to posttransfusion hepatitis.
J. AMER, MED. ASS., 1970, 214, 142-144.

223 - TAYLOR, P.E. & ZUCKERMAN. A.J. - Tests for the hepatitis-associated antigen. Brief report
ARCH. GES. VIRUSFORSCH, 1970, 32, 393-394

224 - TERRIER, E. - L'antigène Australia. Données actuelles.
ANN. BIOL. CLIN., 1970, 28, 287-294.

225 - TOBE, B.A.; ZALAN, E. ; HAMVAS, J.J.; KUDEREWKO, O. & LABZOFFSKY, N.A. - Acute hepatitis associated with the Australia antigen and an unusual virus like particle
GASTROENTEROLOGY, 1971, 60, 180.

226 - TREPO, CH.; THIVOLET, J. - Antigene Australie, Hépatite a virus et périartérite noueuse -
PRESSE MEDICALE, 1970, 78, 36 - 1575.

227 - TRON, P. - L'antigène Australie. Ses relations avec le virus de l hépatite.
GAZ. MED. FR., 1970, 77, 5847-5850.

228 - VALCURONE, G. ; TASSI, G.C. & DE BARBIERI, A. - Antigène Au : correlazioni con l'epatite.
TERAPIA (Milano), 1970, 55, 139-145

229 - VELASCO, M. al.- Hepatitis associated antigen in chronic liver disease.
LANCET, 1970, 1, 779

230 - VERNACE, S. ; PARONETTO, F. & SCHAFFNER, F. - Immune reactions and Australia (HAA) antigen in chronic aggressive hepatitis.
GASTROENTEROLOGY, 1971, 60, 182

231 - VIERUCCI, A.; BLUMBERG, B.S. & MORGANTI, G. - Co-occurence of anti-Ag and anti-Australia antibodies in transfused patients. Possible errors in typing.
VOX. SANG. (Basel) 1970, 19, 425-431.

232 - VIERUCCI, A.; RAGGAZZINI, F.; BORGATTA, L.; LONDON, W.T.; SUTNICK, A & BLUMBERG, B.- Australia antigen and antibody in Italian patients with thalassemia.
CLIN. RES., 1971, 19, 434.

233 - VOGEL, C.L.; ANTHONY, P.P.; MODY, N & BARKER, L.F. - Hepatitis-associated antigen in Ugandan patients with hepatocellular carcinoma.
LANCET. 1970, 2, 621-624.

234 - VYAS, G.N. & SHULMAN, N.R. - Hemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis.
SCIENCE, 1970, 170, 332-333.

235 - WALSH, J.H.; YALOW, R. & BERSON, S.A. - Detection of Australia antigen and antibody by means of radioimmunoassay techniques.
J. INFECT. DIS., 1970, 121, 550-554.

236 - WEWALKA, F. Neuere Aspekte der Serumhepatitis auf Grund von Au/SH-Antigen-Untersuchungen. Kongressberichte d. Dtsch. Ges. F. Bluttransf., Giessen (im Druck).

237 - WILLEMS, F. Th,; RAWLS, W.E. MELNICK J.
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1969, Vol. 130, nº 2

238 - WILLEMS, F.T. et al. - Complement-fixation test for Australia antigen.
LANCET, 1970, 1, 953

239 - WRIGHT, R. ; McCOLLUM, R.W. & KLATSKIN, G. - Australia antigen in acute and chronic liver disease.
LANCET, 1969, 2, 117-121

240 - WRIGHT, R. et al. - Cirrhosis associated with the Australia antigen in an infant who acquired hepatitis from her mother.
BRIT. MED. J., 1970, 4, 719-721

241 - WRIGHT, R. - Distinctions in chronic active hepatitis based on circulating H.A.A.
LANCET, 1971, 1, 184-185

242 - YEUNG LAIWAH A.A.C. - Lymphocyte transformation by Australia antigen.
LANCET, 1971, 2, 7722, 470-471

243 - ZUCKERMAN A.J. et al. - Viral hepatitis and tests for the Australia (hepatitis-associated) antigen and antibody.
BULL. ORG. MOND. SANTE, 1970, 42, 957-992

244 - ZUCKERMAN, A.J.; TAYLOR, P.E. & BIRD, R.G. - Review : antigens and viruses in acute hepatitis.
CLIN. EXP. IMMUNOL., 1970, 7, 439-452

245 - ZUCKERMAN, A.J. - The nature and significance of the Australia antigen. PROC. ROY. SOC. MED., 1971, 64, 273-275.

246 - *ZUCKERMAN, A.J. - Viral hepatitis and the Australia SH antigen.*
NATURE (Lond.), 1969, 223, 569-572

247 - *ZUCKERMAN A.J. & TAYLOR, P.E. - Persistence of the serum hepatitis (SH Australia) antigen for many years -*
NATURE, 1969, 223, 81